

Università degli Studi di Napoli Federico II



DIPARTIMENTO DI **MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI ANIMALI**

Corso di Laurea Magistrale in
Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali

Tesi Sperimentale in
Impatto ambientale

**Tracciabilità del latte e della mozzarella di bufala tramite profilo
metabolomico**

**Traceability of buffalo milk and mozzarella cheese through
metabolomic profile**

Relatore
Ch.^{mo} Prof.
Giuseppe Campanile

Candidato
Marica Raimondo
N74/311

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

A Partenope e alle Tre Grazie

Indice

Riassunto	4
Abstract	6
Introduzione	7
La mozzarella di bufala.....	7
Disciplinare e produzione	12
Adulterazioni alimentari e nuove frontiere di ricerca.....	17
La metabolomica.....	24
Parte Sperimentale	30
Introduzione.....	31
Materiali e Metodi	33
Risultati	39
Discussione	44
Conclusioni.....	47
Bibliografia.....	48

Riassunto

Il metaboloma fornisce un profilo completo dei metaboliti ed è considerato come un metodo affidabile per differenziare l'origine geografica e quindi l'autenticità dei prodotti alimentari.

In Italia, la "Mozzarella di Bufala Campana" ha ottenuto una posizione ben definita nel mercato ed è valorizzata e protetta dal marchio di denominazione di origine protetta (DOP). Poiché, oggi, si cerca regolarmente di immettere mozzarella non autentica nei “premium market” in sostituzione della mozzarella di bufala DOP, l'obiettivo del presente studio è quello di combinare la GC-MS con l'identificazione dei metaboliti a formare una piattaforma tecnologica robusta e ripetibile per la caratterizzazione del metaboloma del latte di bufala e della mozzarella.

Lo studio ha utilizzato 20 caseifici bufalini. Undici caseifici sono siti nell'areale DOP e i restanti nove sono situati in aree non DOP, in Italia. Tutti i caseifici presentano un impianto di lavorazione che produce mozzarella esclusivamente partendo dal proprio latte. È stato ottenuto un pool di campioni di latte crudo (100 mL) e mozzarella (100 g) da ciascun caseificio. Al termine della prova, sono stati rilevati 185 metaboliti endogeni, sia nel latte che nella mozzarella. L'analisi PLS-DA ha chiaramente evidenziato differenze tra i campioni di latte e mozzarella provenienti dall'areale DOP e non DOP.

Per quanto riguarda i campioni di latte, è stato possibile dividere i metaboliti in due classi in base all'area: quelli con concentrazioni più basse nella DOP (es. galattopiranoside, acido idrossibutirrico, allosio, acido citrico) e quelli che hanno concentrazioni più basse nei campioni non DOP (talopirosio, acido pantotenico, mannobiosio, maltosio, fosfato, mannofuranosio, acido dodecanoico, lattosio, acido palmitico, acido N-acetilglutammico, N-acetilglucosamina). La stessa divisione è stata effettuata per i campioni di mozzarella, con alcuni metaboliti (talopiranosio, 2,3-diidrossipropilicoisanoato, sorbosio, acido 4-pneil glutammico, acido ossalico, galattosio) più alto nei campioni DOP e altri (tagatosio, acido lattico, ribitolo, dodecil-

tioglicolato , N-acetilglucosamina, valina, dietilene) più alti nei campioni non DOP. Allo stato attuale, sarebbero necessari ulteriori studi e sforzi riguardo l'applicabilità dell'uso di un approccio metabolomico per scopi legali.

Abstract

The metabolome provides a comprehensive profile of compounds and has emerged as a reliable signature that differentiates the geographical origin and hence the authenticity of food products.

In Italy, “Mozzarella di Bufala Campana” cheese, gained a very well-defined profile in the market, enhanced and protected by a Protected Designation of Origin (PDO) trademark. Since attempts are regularly made to place non-authentic PDO mozzarella in premium markets as a substitute for real PDO buffalo mozzarella, the aim of the present study was to combine advanced GC-MS and metabolite identification in a robust and repeatable technology platform for characterization of the metabolome of buffalo milk and mozzarella.

The study utilized 20 commercial buffalo dairies. Eleven dairies were located in a PDO area and nine dairies were located in non-PDO area in Italy. All dairies had a processing facility that produced mozzarella cheese exclusively from their own milk. Pooled samples of raw milk (100 mL) and mozzarella cheese (100 g) were obtained from each dairy. A total of 185 endogenous metabolites were consistently detected in both milk and mozzarella cheese. The PLS-DA score plots clearly differentiated PDO and non-PDO milk and mozzarella samples. Regarding milk samples, it was possible to divide metabolites into two class according to area: those with lower concentrations in the PDO (Galactopyranoside, Hydroxybutyric acid, Allose, Citric acid) and those which have lower concentrations in non-PDO samples (Talopyranose, Pantothenic acid, Mannobiose, Maltose, Phosphate, Mannofuranose, Dodecanoic acid, Lactose, Palmitic acid, N-acetyl glutamic acid, N-acetyl glucosamine). The same was recorded in mozzarella samples with some metabolites (Talopyranose, 2,3-dihydroxypropyl icosanoate, Sorbose, 4-pnehyl glutamic acid. Oxalic acid, Galactose) higher in PDO samples while others (Tagatose, Lactic acid dimeer, Ribitol, Dodecyl thioglycolate, N-acetyl glucosamine, Valine, Diethylene glycol) higher in non-PDO samples. At present, more studies and efforts should be done on the applicability of the use of a metabolomic approach for legal purposes.

Introduzione

La mozzarella di bufala

La mozzarella di bufala è un formaggio fresco a pasta filata ottenuto dalla caseificazione del latte di bufala (*Bubalus bubalis*), originario della zona che i romani chiamavano Campania Felix e più precisamente della Terra dei Mazzoni. Il legame delle bufale con le zone del casertano è antichissimo e favorito dal particolare microclima caldo e umido, ottimale sia per il benessere degli animali che per le produzioni, e dalla fertilità di queste terre legata alla presenza del fiume Volturno.

Il consumo della mozzarella era già diffuso nel XII secolo, infatti risalgono a quest'epoca i primi documenti storici che testimoniano come i Monaci del monastero di San Lorenzo in Capua erano soliti offrire un formaggio detto “mozza” o “provatura”, se affumicato, ai pellegrini. La commercializzazione dei derivati del latte di bufala risale, invece, al XVI secolo periodo in cui la “mozza” e la “provatura” erano destinate ai ricchi mercati di Napoli e Salerno. Nel 1570, per la prima volta, compare il termine mozzarella in un testo di B. Scappi, famoso cuoco della corte papale. Verso la fine del XVIII secolo, Carlo III di Borbone incentivò la realizzazione di un grosso allevamento bufalino e di uno dei primi caseifici sperimentali della storia nella Reggia di Carditello, la tenuta di caccia dei regnanti spagnoli a San Tammaro, in provincia di Caserta. Durante la dominazione spagnola, quindi, la mozzarella diventò un prodotto di largo consumo. In seguito all'unità d'Italia, venne creato ad Aversa un mercato all'ingrosso dei prodotti caseari derivanti dal latte bufalino, denominato “La Taverna” (Consorzio di Tutela della mozzarella di bufala campana DOP).

L'allevamento bufalino ha poi subito nel primo e soprattutto nel secondo dopoguerra un forte decremento, dovuto alle opere di bonifica e allo sciacallaggio umano, tanto che negli anni '50 questa specie era considerata in via d'estinzione e i capi restanti si concentravano soprattutto nel salernitano. Dagli anni '70 ad oggi, l'incremento dei capi bufalini è stato continuo (figura 1) grazie alla riscoperta rusticità di questa specie e

all'aumento della domanda di mozzarella, soprattutto a livello locale, raggiungendo negli anni gli attuali circa 400.000 capi nazionali, dei quali circa 290.000 presenti solo in Campania (statistiche BDN).

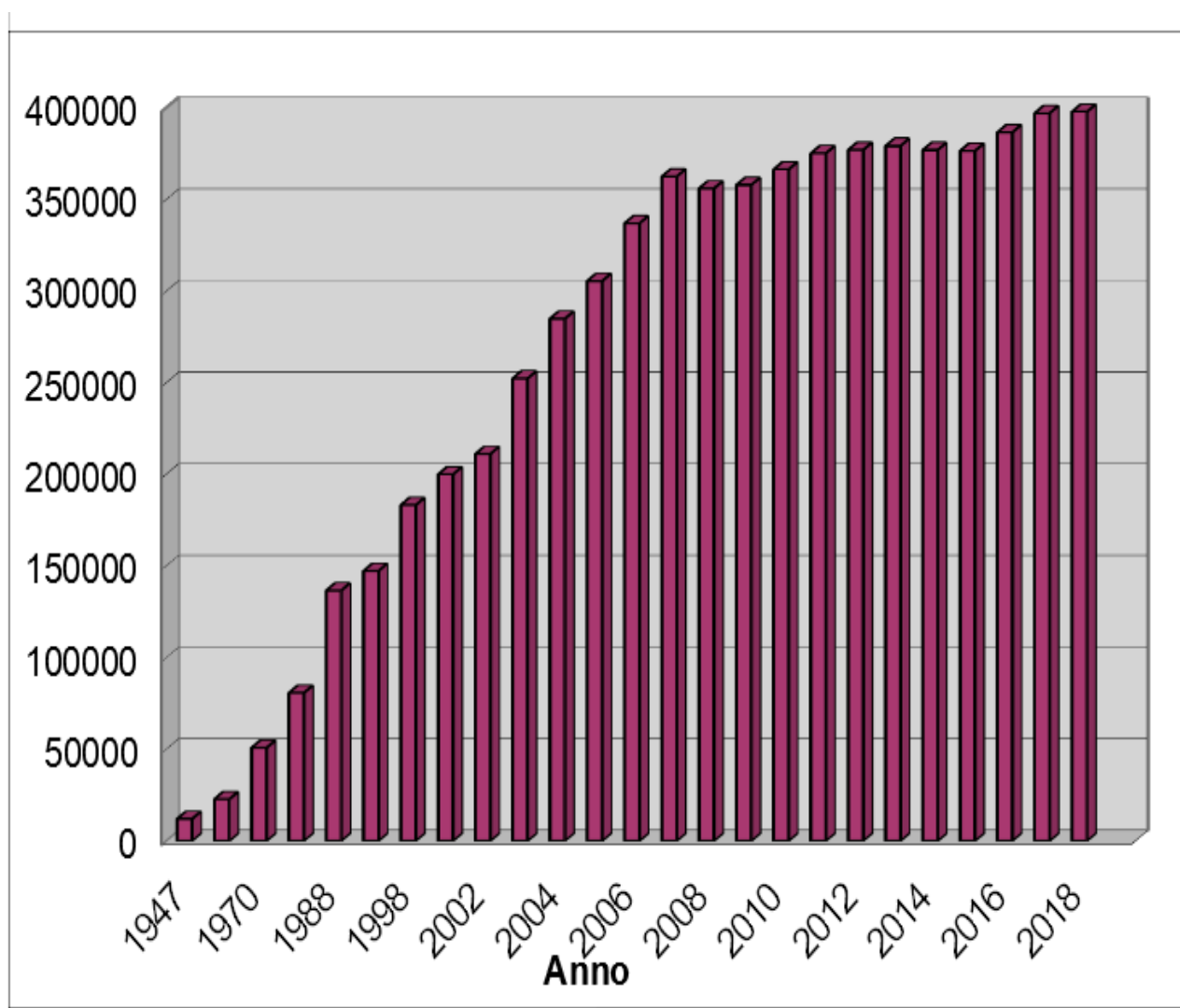


Figura 1. Andamento della popolazione bufalina dal Dopoguerra al 2018 (BDN)

L'incremento bufalino, il miglioramento della filiera e la tutela della mozzarella sono strettamente correlati al riconoscimento della razza Bufala Mediterranea Italiana (BMI), alla nascita dell'ANASB (Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina) e del Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana.

In particolare, con il D.M. del 23/06/1980 è stato istituito il Libro Genealogico (LG) della specie bufalina, strumento reale per il miglioramento genetico, la cui gestione è affidata all'ANASB dal 2000.

In concomitanza con l'affido del LG all'ANASB, sempre nel 2000, è stata riconosciuta la razza BMI. Il riconoscimento della BMI come razza italiana è stato possibile grazie ad una forte selezione e un intenso isolamento, effettuato nel corso degli anni, dalle altre razze bufaline. La BMI appartiene alla popolazione "water buffalo" e in particolare al tipo "river", discendente del bufalo asiatico Arni, che produce un latte più ricco in grassi e proteine rispetto a quello bovino.

Nel 1981, invece, è nato il Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana che rappresenta l'unico organismo riconosciuto dal MIPAAFT per quanto riguarda la tutela, la vigilanza e la valorizzazione di questo formaggio, chiamato per la sua importanza economica e culturale "oro bianco". Uno dei ruoli chiave del Consorzio di Tutela è quello della vigilanza del prodotto finito al momento dell'immissione sul mercato. Infatti, il consorzio presenta una Sezione Ispettiva dedicata al campionamento e alla successiva analisi del prodotto presso i laboratori dell'Ispettorato Centrale Repressione Frodi del Ministero. Nel caso in cui fossero rilevate irregolarità, il Consorzio di Tutela della MBC provvede ad effettuare sanzioni o sequestri amministrativi del prodotto o delle confezioni.

In seguito e grazie alla nascita del consorzio, la Mozzarella di Bufala Campana ha ottenuto nel 1996 la Denominazione di Origine Protetta, meglio nota come DOP, il marchio europeo di tutela destinato a quei prodotti considerati di alta qualità, le cui caratteristiche sono strettamente dipendenti dal luogo di origine e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione si svolgono necessariamente in un'area geografica determinata.

Un ulteriore importante fattore che ha contribuito all'incremento della produzione di MBC e al soddisfacimento della domanda di mercato è rappresentato dalla tecnica della destagionalizzazione, che consiste nell'interrompere la promiscuità sessuale negli allevamenti in determinati periodi dell'anno, ossia da settembre a febbraio. Questo perché la BMI è una specie stagionale a fotoperiodo negativo, ovvero

intensifica l'attività riproduttiva e risulta più fertile al decrescere delle ore di giorno o in generale, quando le ore di buio prevalgono su quelle di luce. Ciò implica che la maggioranza dei parti sia concentrata da agosto in poi, periodo ottimale per la crescita della prole di questa specie nella Valle dell'Indo, zona d'origine del "water buffalo". Tuttavia, in Italia e per le nostre esigenze di mercato, il fotoperiodo negativo comporta un grave svantaggio economico in quanto la domanda di mozzarella aumenta in primavera e in estate, o durante le festività natalizie e pasquali, come si evince dalla figura 2.

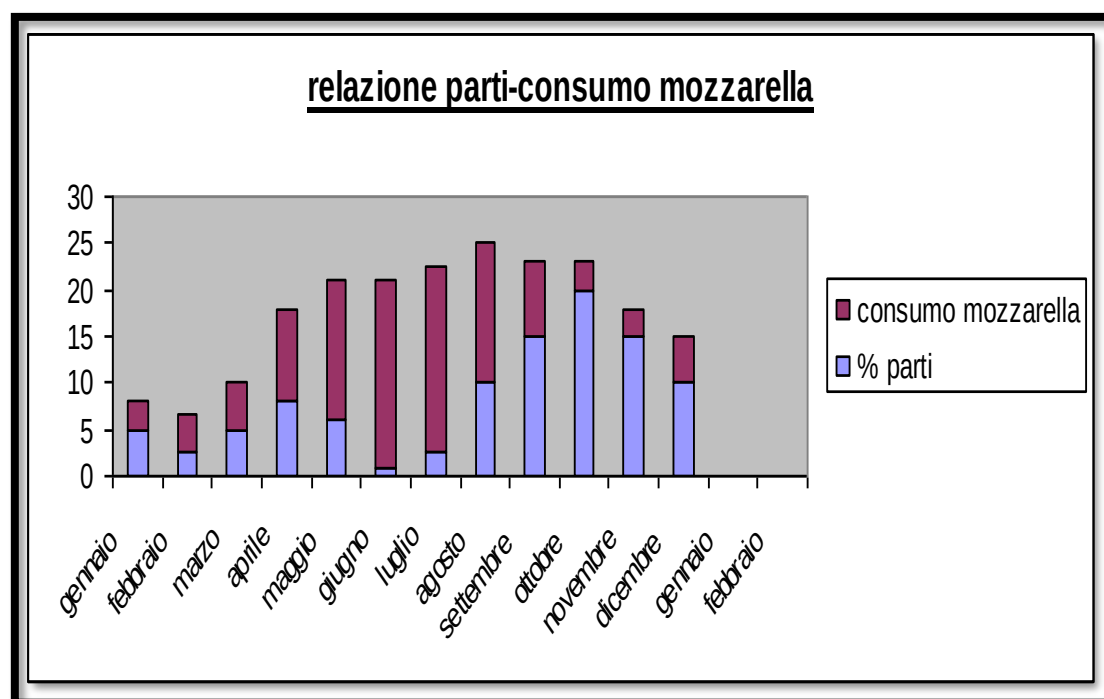


Figura 2. Relazione parti-richiesta di mozzarella sul mercato.

In passato si avviava a questo problema tramite il congelamento del surplus del latte, tuttavia questa pratica è stata vietata dal Consorzio di Tutela sia per evitare l'alterazione della componente organolettica della materia prima, ma anche per tutelare il prodotto da eventuali importazioni di latte congelato da paesi terzi. Ad oggi, con l'applicazione della destagionalizzazione si ottiene un calo del 15% di latte prodotto tra settembre e gennaio, una produzione costante tra febbraio e aprile e un forte aumento tra maggio e agosto per rispondere alle esigenze di mercato.

Ad oggi, la mozzarella risulta essere il più importante marchio DOP del mezzogiorno, il quarto prodotto a livello nazionale per produzione e il terzo tra i formaggi DOP, nonché uno dei prodotti italiani più apprezzati e conosciuti in tutto il mondo. Infatti, una considerevole parte (18%) della produzione totale viene venduta all'estero soprattutto nei paesi europei, ma anche in Russia, Stati Uniti e Giappone. Negli ultimi anni si è verificato un significativo incremento nella produzione, con una media di 33.000 tonnellate prodotte ogni anno. È stato appurato che nel 2018 sono state prodotte quasi 50.000 tonnellate di Mozzarella di Bufala Campana, con un aumento del 5% rispetto all'anno precedente. L'export si è aggirato intorno al 33% (+1% sul 2017), e avviene principalmente verso paesi quali Germania, Francia, Gran Bretagna, Stati Uniti, Spagna e Paesi Bassi (figura 3).

È quindi evidente l'impatto sostanziale e l'influenza della produzione di MBC sull'economia italiana e soprattutto regionale. Si stima infatti che il PIL della Campania sia basato per il 16% circa sulla filiera bufalina.

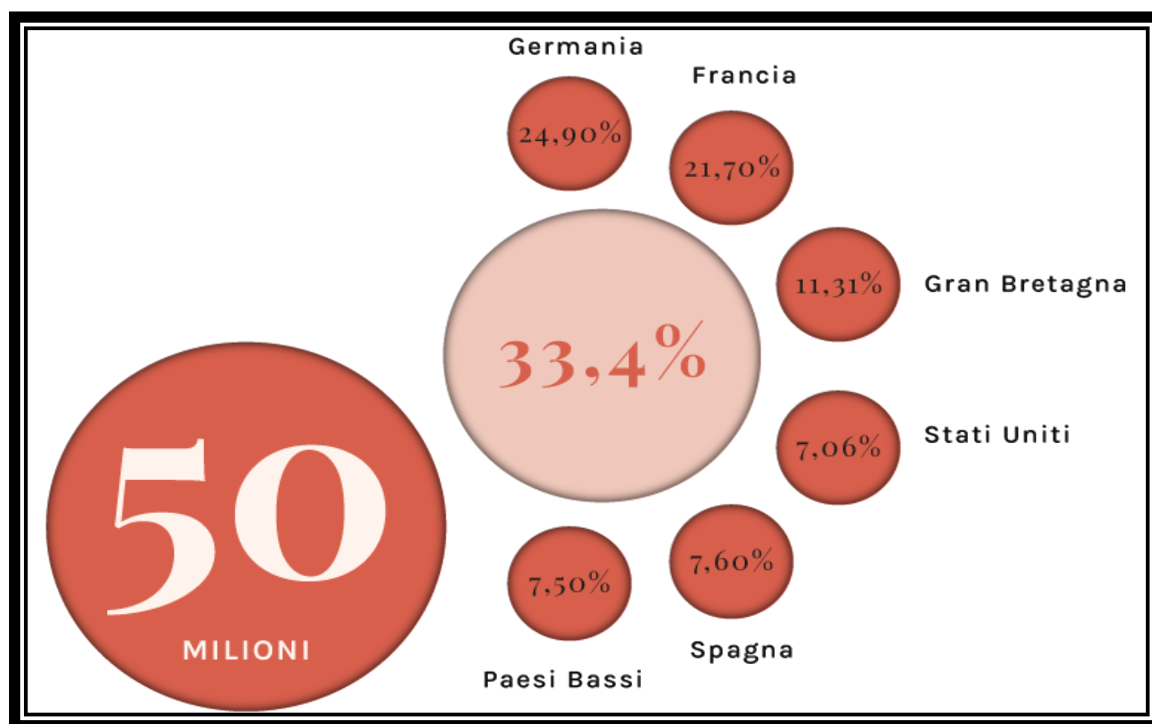


Figura 3. Export di mozzarella nel corso del 2018 (Consorzio di Tutela della MBC).

Disciplinare e produzione

Il marchio DOP comporta il rispetto delle regole stabilite nel disciplinare di produzione, stilato dal Consorzio di Tutela. Nel disciplinare della Mozzarella di Bufala Campana DOP, in particolare all' art. 2, viene designato l'areale DOP che comprende tutta la provincia di Caserta e di Salerno, tre comuni del beneventano, parte della provincia di Napoli, alcuni comuni del Lazio (province di Roma, Frosinone e Latina), parte del foggiano e un solo comune molisano (figura 4).



Figura 4. Areale DOP Mozzarella di Bufala Campana

La Mozzarella di Bufala Campana a marchio DOP deve, quindi, essere prodotta esclusivamente con latte di bufala fresco intero proveniente da allevamenti indenni da tubercolosi, brucellosi e leucosi e siti nell'areale designato, che può essere utilizzato crudo, eventualmente termizzato o pastorizzato. Il disciplinare stabilisce inoltre che il

latte deve possedere tenore in grasso minimo del 7,2%, titolo proteico minimo del 4,2% e trasformato entro e non oltre la 60sima ora dalla prima mungitura.

Il processo di caseificazione prevede innanzitutto l'acidificazione del latte ottenuta per aggiunta di siero innesto naturale, derivante a sua volta dalla caseificazione del giorno precedente o comunque da altre lavorazioni di latte bufalino. Successivamente, il latte viene portato ad una temperatura che oscilla tra i 330°C e i 390°C e, per aggiunta di caglio naturale di vitello, avviene la coagulazione. La maturazione della "cagliata" così formata viene effettuata sotto siero, per un tempo variabile ma comunque compreso intorno alle 5 ore dall'immissione del caglio naturale. Terminata la maturazione, la cagliata viene posta su un tavolo spersoio e successivamente ridotta a strisce, tritata e poi posta in appositi mastelli in legno, in acciaio o in filatrici. In seguito a miscelazione con acqua bollente, la cagliata fila e può quindi essere mozzata in singoli pezzi, delle forme e dimensioni previsti. Sono ammesse dal disciplinare, oltre alla tipica forma tondeggiante, bocconcini, trecce, perline, ciliegine e altre forme tipiche della zona di produzione. Le forme così ottenute, con peso variabile dai 10 gr ai 3 kg ammessi esclusivamente per le trecce, vengono poi messe in acqua potabile fino a rassodamento e poi salate in salamoia. Subito dopo la salatura, avviene il confezionamento o eventualmente l'affumicatura con metodi naturali e tradizionali.

Attualmente, si stima che la produzione sia concentrata per oltre il 60% nel casertano, per circa il 30% nel salernitano e per il restante 10% nelle altre province appartenenti all'areale geografico DOP.

È, però, importante specificare che gli allevamenti bufalini, soprattutto negli ultimi anni, si stanno sviluppando anche in zone diverse da quelle storicamente legate alla filiera bufalina. Troviamo, infatti, allevamenti in regioni quali Calabria e Sicilia, ma anche in regioni del centro e del nord Italia come Toscana, Piemonte, Veneto, dove viene prodotta sia mozzarella che altri formaggi tipici con latte bufalino, come il famoso blue di bufala.

Autenticità alimentare e tracciabilità

Negli ultimi anni i gusti e le preferenze del consumatore sono cambiati, di conseguenza si è evoluto il concetto di qualità. Oggi la qualità viene vista come l'insieme di più caratteristiche o proprietà di un prodotto che gli conferiscono la capacità di soddisfare le richieste del consumatore. Questo vuol dire che il consumatore moderno, sempre più attento, richiede allo stesso tempo qualità nutraceutica, sicurezza alimentare e il rispetto di norme etiche quali il benessere animale e la sostenibilità ambientale. Inoltre, a causa della globalizzazione dei mercati alimentari e dell'incremento della variabilità dei prodotti derivanti da paesi terzi, il consumatore è sempre più interessato a conoscere l'origine geografica degli alimenti che acquista e mangia.

Dall'inizio del XX secolo, sono nate in tutto il mondo delle organizzazioni che stabiliscono degli standard produttivi e controllano l'origine degli alimenti. Degli esempi ci sono dati da organizzazioni quali la francese "Institut National des Appellations d'Origine" (INAO), la spagnola "Spagna Denominación de Origen", la statunitense "American Viticultural Areas" o dall'italiana "Denominazione d'origine controllata" (DOC), ormai compresa nella DOP dal 2010 (Danezis et al., 2016).

In Europa, l'origine geografica rappresenta uno dei maggiori problemi che riguarda l'autenticità degli alimenti, soprattutto per quanto riguarda i prodotti a marchio DOP, IGP e STG. A tal proposito, fortunatamente, con il Reg. CE 1151/2012 (Pacchetto qualità) si tende a proteggere gli alimenti tipici e a incoraggiare le buone pratiche nell'attività agricola e zootecnica. Tali pratiche non solo aiutano i produttori a ricevere dei premi, ma soprattutto tendono a ridurre al minimo la concorrenza sleale, l'immissione sul mercato di prodotti non genuini e di scarsa qualità, salvaguardando quindi quella che viene definita autenticità alimentare.

L'autenticità alimentare è quel processo che va a verificare la conformità degli alimenti tramite la descrizione dell'etichetta e rappresenta uno strumento chiave nel controllo della qualità e della sicurezza alimentare. L'autenticità degli alimenti immessi sui mercati è importante sia dal punto di vista economico, sia da quello legale in quanto è richiesta dalle politiche europee e mondiali poiché le frodi e le adulterazioni degli

alimenti rappresentano, ormai, un problema mondiale che affligge maggiormente i paesi in via di sviluppo e quelli sottosviluppati. In merito all'autenticità e alla trasparenza dei prodotti che arrivano sul mercato, l'Unione Europea sta inoltre ottimizzando le normative riguardanti le informazioni alimentari volontarie ed obbligatorie per l'etichettatura dei prodotti agroalimentari. È infatti necessario l'utilizzo delle etichette, che devono contenere la composizione e la provenienza delle materie prime o del prodotto, ma anche il metodo di produzione (tradizionale, biologico) e le tecniche di elaborazione utilizzate. L'autenticità degli alimenti risulta essere un interesse per molte persone e organizzazioni, come comunità scientifica, forze dell'ordine, produttori alimentari, importatori ed esportatori e, ovviamente, consumatori (Danezis et al. 2016). In definitiva, l'autenticità alimentare è fondamentale specialmente per i prodotti a marchio, ovvero quelli di alta qualità pagati dai consumatori a prezzi più elevati, tra i quali rientra la Mozzarella di Bufala Campana DOP. A tal proposito, a tutela sia del consumatore che dell'allevatore, è nata la tracciabilità.

La tracciabilità può essere definita come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di una materia prima, attraverso tutte le fasi di produzione e di distribuzione. Il concetto di tracciabilità è stato introdotto per la prima volta nel 2002, quando con il Reg. CE 178/2002 venne istituita l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). In particolare, all'art. 18 di tale regolamento venne introdotta per la prima volta la tracciabilità, divenuta obbligatoria dal 01/01/2005 per tutte le filiere del sistema agroalimentare. Il numero di lotto è l'elemento nuovo e fondamentale della tracciabilità, che rappresenta uno strumento con il quale vengono identificati tutti i processi legati al prodotto nel rispetto della normativa.

Nonostante la certificazione DOP ottenuta nel 1996 e il decreto Tracciabilità del 2002, la Mozzarella di Bufala Campana DOP ha subito diversi scandali e attacchi mediatici, ad esempio per il caso diossine del 2008, in seguito per la "Terra dei Fuochi" e per la mozzarella blu, che hanno ovviamente comportato sfiducia nel consumatore e crollo dei prezzi. Per rispondere all'ingigantimento mediatico di queste problematiche e alle infondatezze scientifiche riguardo la diffusione di alcuni dati, un gruppo di giovani

tecnici appoggiati dagli allevatori bufalini, hanno messo a punto una piattaforma online, su base volontaria, per la tracciabilità bufalina chiamata “PrimeDop”. Il sistema, grazie al successo riscontrato, è stato poi promosso dall’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) e patrocinato dalla Regione Campania dal 2012 al 2014. La piattaforma preposta consiste in una sezione dedicata all’allevatore, una all’intermediario e una al caseificio. L’allevatore è tenuto ad inserire settimanalmente il latte di massa prodotto, il numero di capi munti, la quantità “espressa in kg” di latte venduto e/o utilizzato in azienda, il numero di allegato e mensilmente il latte prodotto dai singoli capi; il trasportatore, se diverso dal caseificio, deve dichiarare sulla sezione apposita della piattaforma da chi ha acquistato il latte, con che numero di allegato e a chi vende; infine, per il caseificio la dichiarazione è suddivisa in due fasi: una di acquisto, dove si è tenuti a dichiarare da chi è stato ritirato il latte e con che numero di allegato e una di trasformazione, dove il caseificio è tenuto a caricare le quantità trasformate in mozzarella o altro (ricotta, yogurt, stracchino, ecc) e i dati riguardanti lo stoccaggio del prodotto finito.

Vista l’adesione di un considerevole numero di attori della filiera e il successo della piattaforma, questa ha ottenuto il riconoscimento e il suo utilizzo è stato esteso a tutta la filiera bufalina nazionale grazie al Decreto Attuativo del 09/09/2014. La piattaforma è in continua evoluzione anche grazie alla collaborazione tra il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari Forestali e del Turismo (MIPAAFT) e il Ministero della Salute ed oggi si chiama “tracciabilitabufala.it”. Questo tipo di tracciabilità permette alle autorità preposte al controllo di poter monitorare in tempo reale l’intera filiera e di agire subito in caso di anomalie.

Adulterazioni alimentari e nuove frontiere di ricerca

La Mozzarella di Bufala Campana continua, però, ad essere uno dei prodotti più imitati e oggetto di frode alimentare, come avviene per gli altri prodotti lattiero-caseari.

Il problema delle adulterazioni del latte e dei suoi derivati è probabilmente sempre esistito ma è emerso a livello globale nel 2008, in seguito alla scoperta delle sofisticazioni con melammine che subivano i prodotti per neonati e bambini in Cina (Xin & Stone, 2008). La causa delle frodi alimentari a carico dei prodotti lattiero-caseari è essenzialmente economica e riconducibile in primo luogo ad un forte divario tra domanda e offerta, soprattutto considerando l'aumento demografico nei paesi in via di sviluppo e quindi l'incremento della domanda di proteine di origine animale e, in secondo luogo, alla deperibile natura del latte e di alcuni suoi derivati.

Il latte viene quindi adulterato per aumentarne la resa alla caseificazione o allo scopo di allungarne la “shelf life”. A tal fine, viene diluito o sofisticato nella composizione chimica con proteine di origine vegetale o con siero e latte di altre specie. Sono inoltre impiegati alcuni composti chimici come conservanti. Alcuni esempi ci sono dati dall'utilizzo di formalina, acido salicilico, acido benzoico e perossido di idrogeno che, appunto, aumentano la “shelf life” del latte (Singh et al. 2015). L'urea commerciale e le melammine, invece, vengono aggiunte al latte per falsarne il contenuto in proteine. Ancora, talvolta, il grasso del latte viene rimosso per essere rivenduto separatamente e questa rimozione è compensata dall'emulsione di oli vegetali al latte tramite utilizzo di detergenti, che gli conferiscono poi la tipica consistenza schiumosa desiderata dal consumatore (Singuluri & Sukumaran, 2014).

Purtroppo, l'utilizzo smodato di alcuni adulteranti non solo inganna il consumatore, ma può portare anche a problemi di salute nel lungo periodo. Ad esempio, le melammine possono comportare diarrea ed eccessivo accumulo di amido che, nei pazienti diabetici, può essere fatale (Singuluri & Sukumaran, 2014). Invece, l'urea va a sovraccaricare il fegato e le proteine vegetali come quelle del latte di soia, di mandorla e di grano, pisello, riso, sono indicate o riconosciute clinicamente come allergeni.

Le autorità preposte al controllo alimentare, pertanto, richiedono un aggiornamento continuo delle tecniche analitiche utilizzate per accertare la qualità e l'autenticità alimentare.

Nel caso specifico della MBC, l'adulterazione più comune che subisce questo importante formaggio avviene a carico della materia prima che viene mescolata con il latte bovino, molto più economico rispetto a quello di bufala. È stato infatti stimato che il latte di bufala rappresenta solo l'11, 2% della materia prima utilizzata per la produzione di MBC, rispetto alla controparte bovina dell'85% circa (Gerosa et al. 2012). Il metodo di riferimento europeo per l'identificazione di proteine bovine nei prodotti lattiero-caseari è basato sulla focalizzazione isoelettrica su gel delle γ -caseine in seguito a plasminolisi, con un limite di determinazione di latte bovino in prodotti caseari bufalini dell'1% (Regolamento CE 273/2008). Però, non è semplice e chiaro interpretare i risultati ottenuti con tale metodo a causa della sovrapposizione di bande specie-specifiche generate dai complessi profili proteici, che possono causare falsi positivi.

Negli ultimi anni i metodi più usati per accertare l'autenticità del latte e per valutarne la composizione chimica, tramite l'identificazione di alcuni componenti, sono stati basati essenzialmente sulla cromatografia, ormai ritenuta parte degli standard produttivi (Cubero-Leon et al. 2014), insieme a tecniche quali la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR), la spettroscopia a infrarosso (IR) e risonanza magnetica nucleare (NMR). Ancora, recentemente la ionizzazione elettrospray (ESI) è stata impiegata per la determinazione e la quantificazione di latte bovino sia nel latte bufalino che nella mozzarella utilizzando la β -lattoglobulina come marcatore molecolare (Czerwenka et al. 2010). Tuttavia, per avere un maggiore controllo delle frodi e una migliore tracciabilità, negli anni, sono state sviluppate e si stanno ancora sviluppando diverse metodologie analitiche basate su tecniche biomolecolari per l'identificazione della specie produttrici nei prodotti lattiero-caseari. Ad esempio, metodi basati sulla PCR utilizzano sequenze di DNA specie-specifico come "markers" per i bovini e i bufali. Inoltre sono stati sviluppati e proposti saggi di PCR Real Time per fornire informazioni quali-quantitative per la determinazione dell'aggiunta di latte bovino alla MBC, con un livello di sensibilità che varia dallo 0,1 al 2% (Dalamasso et

al. 2011). Tuttavia, è sempre richiesto uno step preliminare per l'estrazione di DNA. Ciò comporta un limite, nonostante la dimostrata utilità di queste tecniche. Diversi metodi analitici per la determinazione della mozzarella adulterata con latte bovino sfruttano le differenze specie-specifiche nelle sequenze amminoacidiche. A titolo esemplificativo, alcune di queste tecniche sono basate sull'identificazione di proteine del siero quali la β -lattoglobulina e l' α -lattoalbumina grazie all'utilizzo dell'elettroforesi capillare o alla cromatografia liquida ad alta prestazione (RP- HPLC) (Cartoni et al. 1999). Però è importante sottolineare che questi metodi possono essere limitati dalla presenza di co-eluenti o di interferenti all'interno dei profili cromatografici.

Anche la spettrometria di massa (MS) ha dimostrato di essere uno strumento altamente specifico per l'identificazione qualitativa di latte bovino in prodotti bufalini.

Oltre alla diluizione e all'aggiunta del più economico latte bovino, il latte di BMI viene sostituito con latte di “water buffalo” importato e quindi proveniente da paesi quali Canada, Polonia, Venezuela, Romania. Per contenere questo fenomeno ed incrementare i controlli imposti dalla legislazione europea riguardo i prodotti a marchio DOP, in questi anni, si sta diffondendo una tecnica detta Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI- TOF MS), che rappresenta un approccio autonomo della spettrometria di massa per la determinazione di adulterazioni che interessano il latte bufalino e la mozzarella (Caira et al. 2013). La tecnica MALDI- TOF MS può essere considerata come un miglioramento della precedente MALDI, che non forniva una determinazione quantitativa “pura”. La distinzione tra campioni di latte prodotti da diverse razze animali è difficile perché mancano ancora marcatori genetici specifici, tuttavia la MALDI- TOF MS pare stia ovviando a questi limiti. Questo è possibile anche perché la bufala mediterranea allevata in Italia e tutelata nel corso degli anni dall'ibridazione con altre razze, mostra un ridotto polimorfismo delle proteine del latte rispetto ad altre razze bufaline, ad esempio le americane. Per questo, poiché le caseine sono incorporate nei prodotti caseari, possono fornire le informazioni riguardanti l'origine dei campioni di latte.

In diversi studi, come in quello di Caira et al. del 2016, proprio per la determinazione dell'origine geografica del latte bufalino e della presenza di latte bovino nella MBC sono stati esaminati le caseine di “water buffalo” e campioni di cagliata di razze autoctone italiane e di ibridi internazionali per identificare “peptidi segnale” da usare come indicatori di origine per i prodotti lattiero-caseari. Sono stati così identificati dei peptidi specie- specifici che hanno contribuito a determinare, simultaneamente, latte e formaggio proveniente da quattro specie differenti. Questo nuovo approccio è basato sulla digestione di miscele complesse, contenenti caseine, con tripsina. È stato così visto che il locus della β -caseina è monomorfo, mentre l' α_{s1} - caseina mostra solo due varianti silenti nella BMI. Di contro, i campioni di latte bufalino rumeni, canadesi, polacchi e venezuelani posseggono più varianti di caseine, ad esempio la β - caseina A e l' α_{s1} -caseina presenta 8 residui amminoacidici eliminati dalla posizione 35 alla 42. Partendo quindi da queste proteine, con la digestione enzimatica, possono essere creati degli insiemi di “peptidi segnale”. Questi possono poi essere sequenziati e differenziati con la spettrometria di massa (MS). La conoscenza delle sequenze amminoacidiche delle caseine consente la previsione delle masse molecolari dei peptidi digeriti con tripsina, confrontandole poi con i dati ottenuti dalla MALDI-TOF MS o dalla MS tandem. La ricerca risulta essere positiva se le masse molecolari previste e misurate dei peptidi segnale sono coincidenti. L'adulterazione del latte viene poi quantificata mediante l'utilizzo di peptidi sintetici analoghi, presi come standard. I vantaggi della MALDI- TOF MS sono costituiti dal fatto che i peptidi sono più facilmente isolabili rispetto alle proteine e che questa tecnica risulta molto veloce, non necessitando della separazione cromatografica. In definitiva, questa tecnica analitica consente il rilevamento delle caseine delle razze bufaline internazionali e di quelle bovine con una sensibilità, rispettivamente, del 2% e dello 0, 78% (Caira et al. 2016).

In merito a questa problematica bisogna specificare che, oltre le sofisticazioni a carico del latte che entra nella filiera bufalina, esiste un altro fenomeno che va crescendo ovvero l'imitazione e quindi la creazione di sostituti illegali di alcuni prodotti.

Per tutte queste ragioni, oggi, considerando l'importanza del mantenimento dell'integrità dei prodotti DOP come la Mozzarella di Bufala Campana, si sta pensando a nuove prospettive di ricerca e a nuovi approcci che possano essere complementari

alle tecniche di screening già esistenti per andare a migliorare la tracciabilità della filiera e, quindi, a garantire l'integrità del prodotto. Queste nuove tecniche sono pensate anche per migliorare l'efficienza riproduttiva della bufala, che è alla base della produzione di latte, e per andare ad analizzare ed enfatizzare le proprietà nutraceutiche e bioattive dei prodotti derivanti dalla specie bufalina.

Rientrano in quest'ottica le discipline "omiche", ovvero quelle scienze basate su un approccio olistico e quindi globale, integrato e organizzato per lo studio della complessità biologica.

Le scienze omiche sono:

- la genomica che va a studiare la struttura, la sequenza, la funzione e l'evoluzione dei geni, nel contesto dell'intero genoma e si contrappone alla genetica, che invece è la scienza che studia i singoli geni, l'ereditarietà e la variabilità degli organismi;
- la trascrittomica, disciplina che si occupa dell'insieme degli RNA messaggeri di una cellula, detto appunto trascrittoma. La conoscenza degli RNA messaggeri è importante in quanto da questi, attraverso il processo biochimico di traduzione o sintesi proteica, derivano le proteine;
- la proteomica studia il proteoma, ovvero il complesso delle proteine espresse da una cellula o da un organismo. La proteomica mira quindi a identificare le proteine e ad associarle ad uno stato fisiologico, andando a correlare il livello di proteine prodotte da una cellula o tessuto e l'inizio o la progressione di uno stato di stress;
- la metabolomica, scienza olistica che studia i processi e le alterazioni delle attività metaboliche e quindi l'insieme dei metaboliti.

Le discipline omiche sono fra loro complementari, quindi stanno comportando uno spostamento dalla classica analisi riduzionistica della biologia ad un approccio globale, cosicché la complessità biologica non venga più vista come un sistema gerarchico, ma come una struttura ricca di interconnessioni. Dunque, la nuova sfida lanciata con queste innovative discipline è quella di andare a ricostruire una sorta di "flusso" delle

informazioni biologiche (figura 5), ad esempio, partendo dalla genomica che va ad indicarci ciò che “potrebbe accadere” fino ad arrivare alla metabolomica che ci mostra ciò che “è già accaduto”, considerando anche tutti i fattori che hanno potuto generare un mutamento.

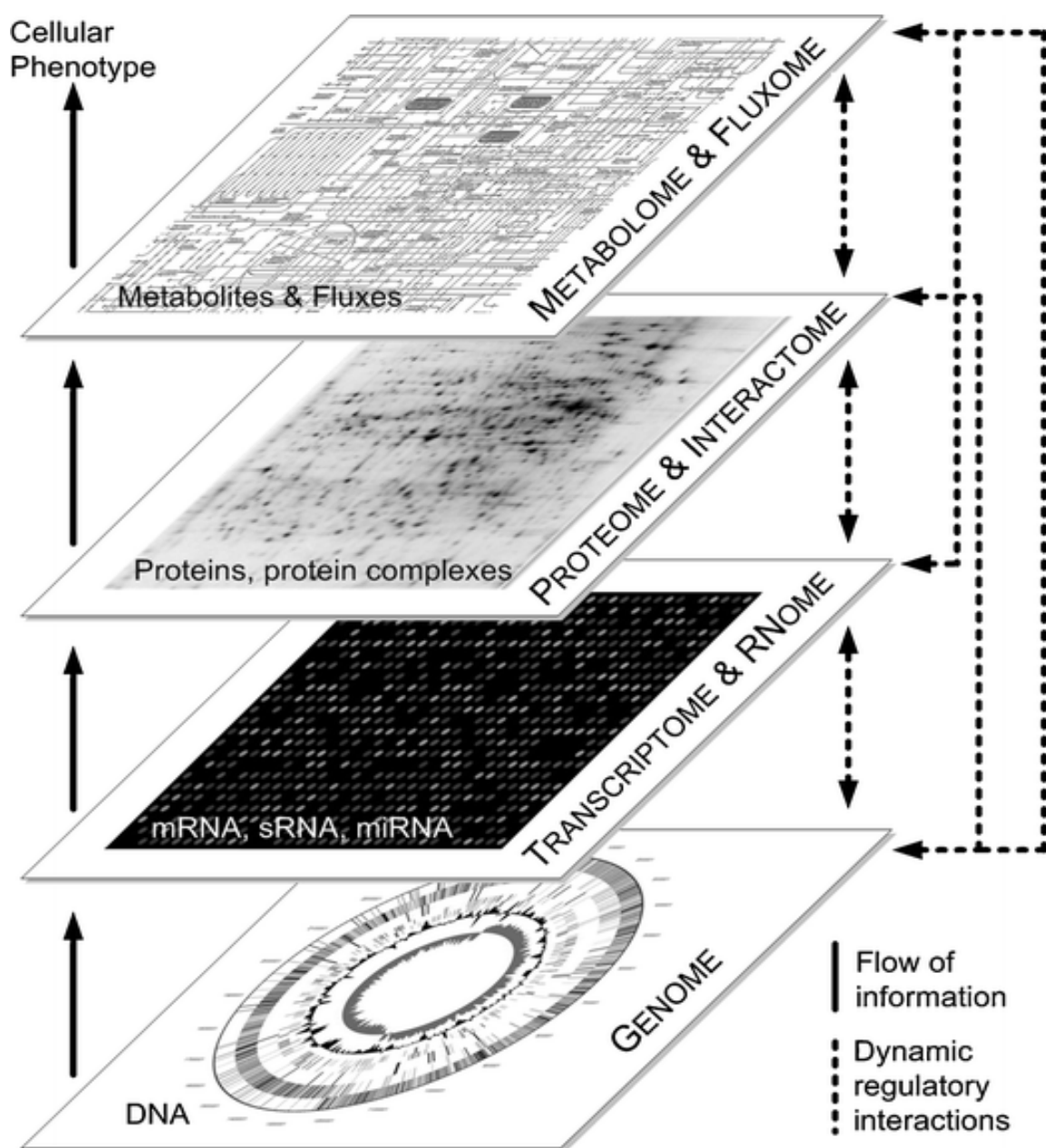


Figura 5. Flusso delle informazioni biologiche tramite le scienze omiche

L'avvento delle scienze omiche coincide con un forte miglioramento tecnologico in vari ambiti come la biologia molecolare e l'informatica, che, sinergicamente, vanno ad accelerare significativamente la ricerca. Ad oggi, infatti, queste discipline vengono considerate come un potente strumento di screening di biomarkers specifici di malattie, utili nell'identificazione di stadi pre-patologici o asintomatici ed applicati ad una vasta gamma di campi compreso quello alimentare, per risolvere problemi di frodi.

Per quanto riguarda l'autenticità alimentare, genomica (nutrigenomica) e proteomica si stanno rapidamente affermando e sostituiranno, nel breve periodo, le tecniche classiche. La genomica, previa PCR, consente di analizzare prodotti altamente trasformati o contenenti contaminanti grazie all'elevata stabilità del DNA. La proteomica, invece, grazie allo studio del proteoma permette l'analisi delle proprietà degli alimenti lungo tutto la filiera, in quanto le proteine fungono da "markers". La sensibilità di questi nuovi metodi è molto elevata, anche perché richiedono una piccola quantità di materiale come campione. Genomica e proteomica vengono solitamente applicate per identificare le anomalie nell'etichettatura degli alimenti. Esempi interessanti ci sono dati dal rilevamento di OGM, dall'autenticazione dei frutti di mare, dal rilevamento di carne di cavallo e maiale negli alimenti etichettati come carne di manzo, dall'origine vegetale degli alimenti come olio d'oliva, vino o prodotti a base di pomodoro.

La metabolomica

Per quel che concerne il nostro caso, in particolare, la metabolomica, può essere definita come l'analisi qualitativa e quantitativa completa di tutti i metaboliti presenti in un biofluido, in una cellula, in un tessuto, in un organismo.

Il termine metaboloma è stato coniato da Oliver (Oliver et al. 1998) ed indica l'insieme dei metaboliti di un organismo biologico, ovvero l'insieme dei prodotti finali e intermedi della sua espressione genica. Il metaboloma è costituito dall'endometaboloma, ovvero l'insieme dei metaboliti intracellulari, e dall'esometaboloma, l'insieme dei metaboliti che vengono secreti all'esterno o nel fluido extracellulare. Il metaboloma è strettamente dipendente dallo stato fisiopatologico e di sviluppo, ciò vuol dire che può variare con il tempo, in base all'alimentazione, in relazione ai cambiamenti nello stile di vita, sotto l'influenza dell'epigenetica, ecc (figura 6).

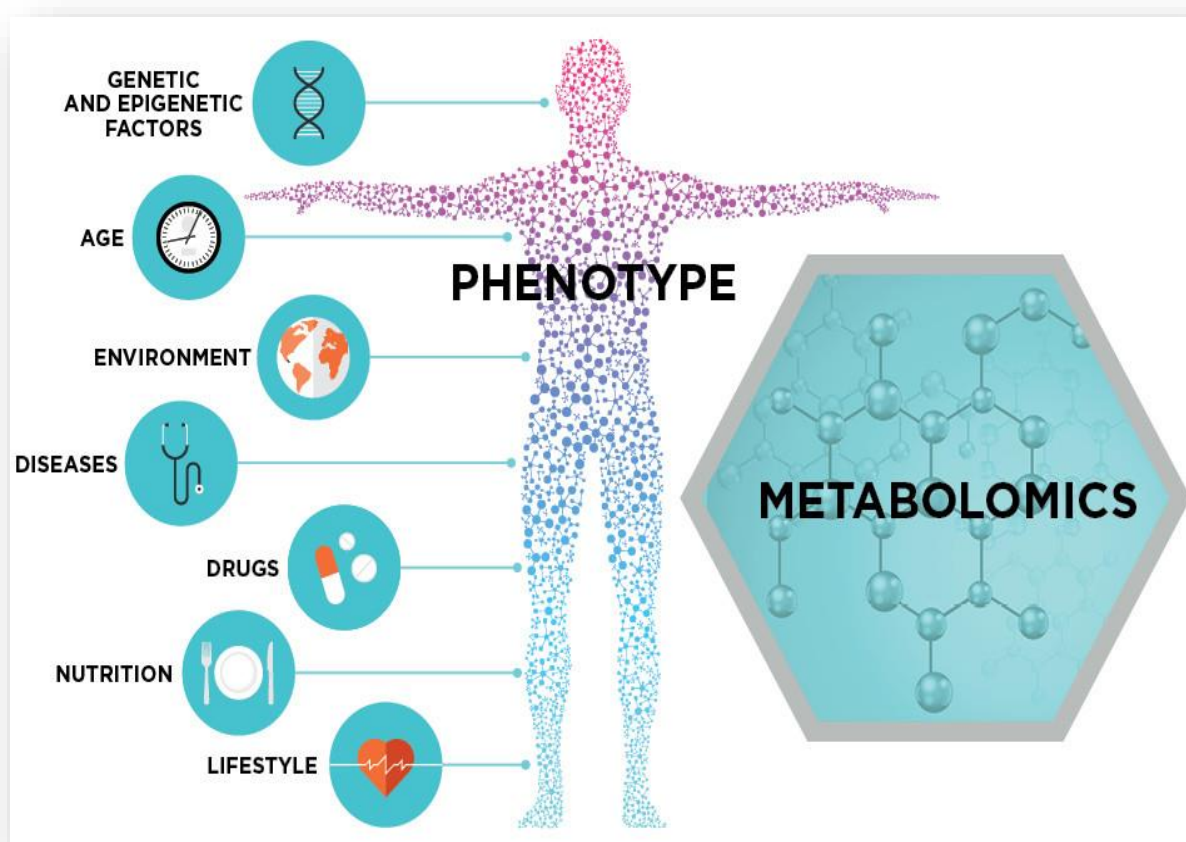


Figura 6. Metabolomica e fattori influenzanti il fenotipo.

Gli studi del metaboloma possono generalmente essere distinti in base all'obiettivo dell'analisi in:

- informativi, dove è necessaria la determinazione e la quantificazione dei metaboliti per ottenere informazioni;
- discriminativi, usati per trovare le differenze tra diversi campioni;
- predittivi, mirati a creare modelli statistici per predire l'appartenenza ad una determinata classe (Cevallos- Cevallos et al. 2009).

La metabolomica utilizzata per preservare l'autenticità alimentare è, in genere, di tipo discriminativo o predittivo.

Gli studi riguardanti la metabolomica possono essere eseguiti usando analisi mirate (target) o non mirate (untarget). Le analisi mirate, di solito, vanno a quantificare gruppi di metaboliti correlati fra loro, mentre le analisi non mirate vanno a determinare più metaboliti possibili senza la necessità di quantificarli. L'applicazione delle analisi mirate potrebbe fornire delle informazioni funzionali dirette come dati da utilizzare poi da modelli funzionali metabolici. Tuttavia, le analisi non target possono determinare dei modelli differenti tra diversi gruppi di campioni. Quindi, la metabolomica non mirata potrebbe essere usata in futuro, per classificare dei campioni sulla base di modelli già identificati, in combinazione con modelli statistici e algoritmi.

L'analisi metabolomica segue un flusso di passaggi che prevedono la raccolta dei campioni da analizzare e la successiva fase di analisi, che può avvenire attraverso vari approcci. Gli approcci ad oggi più usati sono il profilo metabolico e il metabolic fingerprinting.

Il profilo metabolico si basa sull'analisi di un gruppo di metaboliti e nella maggior parte dei casi è un approccio basato sull'ipotesi, che comporta lo studio di un set di metaboliti associato a determinati *pathway* (Oms- Oliu et al. 2013).

Il metabolic fingerprinting, invece, è sicuramente un approccio più veloce. Con questo approccio non si vuole tanto identificare il metaboloma, ma piuttosto comparare diversi patterns o "impronte digitali" di metaboliti che possono mutare in relazione all'ambiente, ad un'alterazione genetica, ad una malattia. Ciò vuol dire che il metabolic fingerprinting non fornisce un'informazione quali-quantitativa sulle concentrazioni dei

metaboliti, ma piuttosto dà una “istantanea” dello stato metabolico del sistema biologico attraverso lo studio di spettri, che risulta molto complesso. Infatti, nonostante la metabolomica miri a creare un profilo per tutti i metaboliti presenti in un campione, nessun metodo analitico è in grado di estrarre e determinare tutte le differenti molecole contemporaneamente. Questa è la ragione per la quale, l’approccio di determinazione fingerprinting, soprattutto nel settore alimentare, include tecniche quali la risonanza magnetica nucleare (NMR), la spettrometria a raggi infrarossi (IR), alcuni metodi basati sulla spettrometria di massa (MS) e rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID). Quindi, gli approcci del profilo metabolico e dell’analisi fingerprinting vengono impiegati soprattutto per valutare l’impatto dell’agricoltura, la composizione chimica degli alimenti durante le fasi di trasformazione e conservazione, per l’identificazione di nuovi composti bioattivi e, appunto, per studiare l’autenticità alimentare.

Nonostante gli approcci tradizionali siano ancora usati, la metabolomica e l’analisi fingerprinting in particolare, sta ricevendo interesse crescente per quanto riguarda le adulterazioni alimentari e oggi è già usata in alcune matrici alimentari, soprattutto di origine vegetale. Negli ultimi dieci anni, infatti, il miglioramento della chimica analitica, dei software utilizzati per elaborare i data-set creati e dei modelli statistici e matematici, ha comportato una veloce crescita della metabolomica. Ad oggi, nel settore alimentare, l’analisi del metaboloma viene effettuato soprattutto per la determinazione delle frodi riguardanti i prodotti vegetali, il che potrebbe costituire una sorta di “linea guida” per l’identificazione di sofisticazioni anche in altre matrici alimentari di origine animale.

Per i prodotti di origine vegetale, per una corretta analisi, partendo dalla fase di campionamento, è fondamentale considerare la veloce attività metabolica delle piante. A tal fine può essere utile mantenere la temperatura intorno ai 4°C per la fase di preparazione e scendere fino a -80°C durante lo stoccaggio dei campioni. La preparazione dei campioni comprende inoltre l’estrazione dei composti, che deve essere congrua al tipo di processo analitico utilizzato. Ad esempio, l’estrazione con la tecnica “spazio di testa”, nonostante sia più indicata per l’estrazione di campioni altamente volatili, è stata impiegata di recente per la caratterizzazione dell’olio di cocco (Mansor et al. 2011). Altri esempi per la preparazione dei campioni volatili ci

sono dati dalla microestrazione in fase solida (SPME), usata per estrarre dagli alimenti i composti più volatili e ancora, dalla SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction), usata per la caratterizzazione del vino e dalla PT (Purge and Trap), di recente provata per l'estrazione di composti volatili nel miele (Tananaki et al. 2007). Tuttavia queste tecniche sono poco comuni in quanto sono lente e poco sensibili. Quindi, l'estrazione viene effettuata, in genere, tramite la gas-cromatografia (GC).

Nel caso di matrici liquide, i protocolli di estrazione sono molto semplici come nel caso della sonicazione, usata ad esempio per la birra e la centrifugazione, impiegata per la separazione delle particelle solide nei succhi di frutta (Vaclavik et al. 2012).

Per matrici solide l'estrazione dei campioni, che sono generalmente sotto forma liofilizzata o macinati, avviene con metanolo, acqua e metanolo, etanolo ed acqua o tramite estrazione in fase solida (SPE), che risulta tuttavia più lenta e specifica.

Un importante esempio dell'applicazione della metabolomica contro le frodi alimentari ci viene fornito dal caso dell'olio extra vergine di oliva. Gli oli vegetali, in generale, sono molto richiesti dai consumatori negli ultimi anni in quanto i loro grassi sono preferiti a quelli di origine animale. I benefici sulla salute degli oli vegetali dipendono dal tipo di specie botanica di origine. Sicuramente, il più importante dal punto di vista salutistico è l'olio di oliva e in particolare, il più benefico è considerato l'olio extra vergine di oliva che è, inoltre, il più costoso tra gli oli vegetali. L'olio di oliva rappresenta il prodotto alimentare che subisce più sofisticazioni, precedendo solo il latte in polvere. Viene generalmente adulterato con oli più economici come quelli di nocciole, di semi, di girasole o con altri oli di oliva raffinati. L'identificazione di queste frodi con i metodi classici di analisi, rappresenta un vero e proprio problema in quanto non è semplice distinguere la composizione in trigliceridi, steroli e altri acidi grassi di queste matrici, a causa della loro forte similitudine. Per tale ragione, si stanno sviluppando e diffondendo nuove tecniche per la determinazione della qualità di questo prodotto, tra cui appunto metodiche basate sul metabolic fingerprinting.

Per gli studi sulla metabolomica riguardo l'olio di oliva, si è partiti dall'esame del profilo metabolico non-mirato di alcuni campioni per andare a caratterizzare i vari tipi di oli di oliva. Per qualità e l'autenticità dell'olio, è fondamentale considerare il luogo

d'origine, il suolo agronomico, le condizioni pedoclimatiche e le tecniche di lavorazione soprattutto perché l'olio di oliva rappresenta uno dei prodotti a marchio più importanti in Italia. Oltre alla composizione in acidi grassi per la caratterizzazione degli oli, più recentemente, sono stati effettuati degli studi basati su metaboliti non mirati di campioni di vari oli di oliva. La NMR e la spettroscopia a IR sono ampiamente utilizzati per la caratterizzazione geografica degli oli di oliva, dato che non richiedono trattamenti preliminari per i campioni. In particolare, uno studio di Woodcock et al., nel 2008, ha ottenuto ottimi risultati nel confermare l'origine geografica dell'olio di oliva ligure sviluppando degli spettri "fingerprinting" per gli oli basati sulle tecniche dell'analisi discriminante PLS- DA.

Tornando alla mozzarella, si può quindi affermare che l'applicazione della metabolomica come nuova prospettiva per il miglioramento della filiera DOP è possibile perché i metaboliti possono essere "tracciati" partendo dagli organismi viventi, dalla materia prima, passando per il processo di trasformazione e fino ad arrivare alla fase di conservazione e stoccaggio. Infatti la determinazione dell'origine geografica è ampiamente studiata tramite l'analisi di multi-elementi e del rapporto isotopico, proprio per andare a proteggere quelli che sono i prodotti a marchio DOP e per evitare l'uso e la diffusione di etichette falsate (Drivelos & Georgiou, 2012). La composizione isotopica del latte è influenzata dalla composizione dell'acqua bevuta e dalle specie vegetali consumate dagli animali, passando poi alla composizione del suolo che è a sua volta influenzata da vari fattori, quali le pratiche agronomiche e le condizioni climatiche e geologiche (Sacco et al. 2009). È però fondamentale gestire bene la fase della preparazione dei campioni, in quanto possono verificarsi effetti isotopici in seguito a reazioni scatenate da errate procedure di estrazione e quindi può verificarsi una variabilità nelle proprietà del campione.

Recentemente, il latte e i suoi derivati sono stati studiati utilizzando la tecnica del metabolomic fingerprinting tramite la risonanza magnetica nucleare NMR. Sembra che un'accurata determinazione dell'origine dei prodotti lattiero-caseari sia fattibile solo quando vengono studiati più parametri. Quindi, a tal proposito, un approccio combinato tra la metabolomica e appositi metodi matematici e statistici può consentire

una buona e corretta determinazione del latte e dei suoi derivati, ad esempio, in base alla loro origine geografica.

Parte Sperimentale

Introduzione

Come è già stato evidenziato, l'autenticità e l'integrità dei prodotti alimentari risultano essere fondamentali per la protezione dei mercati nell'ambito di un sistema alimentare ormai globalizzato. Oggi gli alimenti ed in particolare, quei prodotti di nicchia venduti a prezzi più elevati, sono spesso oggetto di frodi commerciali quali l'utilizzo di etichette false o di sofisticazioni delle materie prime (Alvarez et al. 2013). Importanti esempi, di cui si è già trattato in precedenza, ci sono forniti dai casi dell'olio di oliva o dei prodotti lattiero-caseari in generale.

La mozzarella è apprezzata in tutto il mondo per le sue speciali qualità alimentari, tanto da essere tutelata dal marchio DOP. Negli ultimi anni, le frodi a carico di questo importante prodotto vengono effettuate allo scopo di far entrare nei “premium market” mozzarella generica come sostituto della mozzarella di bufala (Russo et al. 2012; Pignata et al. 2015; Caira et al. 2016).

Le continue minacce alla mozzarella hanno comportato lo sviluppo di nuove tecniche di screening che possano assicurare la purezza e la tracciabilità riguardo l'origine geografica di questo prodotto. Gli approcci usati finora per garantire l'autenticità alimentare, come la MALDI-TOF-MS, mirano alla ricerca di un numero limitato di composti. Il metaboloma, e in particolare il metabolic fingerprinting, fornisce un profilo globale dei composti e quindi costituisce un metodo affidabile per la differenziazione dell'origine geografica dei prodotti alimentari. L'approccio metabolomico è, quindi, una strategia di successo per confermare la genuinità dei prodotti alimentari (Cevallos-Cevallos et al. 2009).

Ad oggi, sono pochi gli studi riguardo la valutazione delle variazioni indotte dalla dieta, dalla zona di origine e più in generale delle tecniche di allevamento negli animali da latte mediante lo studio del metaboloma (Sun et al. 2015). Questi studi sono stati basati sull'uso della spettroscopia NMR o della spettroscopia HRMAS NMR (Mazzei & Piccolo, 2012). Pertanto, lo scopo della tesi è quello di sviluppare un metodo di analisi per l'acquisizione e la caratterizzazione del metaboloma estratto da campioni di latte e di mozzarella di BMI, per la definizione di un data set metabolomico dei dati

ottenuti dallo screening e della relativa determinazione del profilo metabolomico di tipo non-target, (non mirato) dei campioni, al fine di garantire l'autenticità del marchio DOP riservato ai prodotti lattiero-caseari bufalini.

Materiali e Metodi

Per questo studio, sono stati prelevati campioni di latte di massa e mozzarella da 20 caseifici bufalini. In particolare, 11 campioni derivano da caseifici siti nell'areale DOP e i restanti 9 sono stati prelevati da caseifici dislocati sul territorio nazionale in zone non comprese nell'areale DOP (tabella 1).

CAMPIONI AREA DOP	CAMPIONI AREA NON DOP
Salerno	Catanzaro
Salerno	Cosenza
Salerno	Crotone
Salerno	Toscana
Caserta	Treviso
Caserta	Treviso
Caserta	Padova
Benevento	Brescia
Latina	Udine
Latina	
Napoli	

Tabella 1. Derivazione geografica dei campioni usati per la prova.

Tutti i caseifici facenti parte della prova sperimentale possiedono impianti di lavorazione che trasformano il loro stesso latte in mozzarella. Da ogni caseificio è stato poi ricavato un pool di campioni costituito da 100ml di latte di massa crudo e 100g di mozzarella. Tutti i campioni sono stati processati in maniera simile e sono stati ottenuti dopo circa due ore dall'inizio della preparazione degli stessi. I campioni di mozzarella ottenuti sono stati immersi in siero e conservati a 25°C fino al momento dell'analisi metabolica.

Per quanto concerne l'analisi metabolomica, l'estrazione, la purificazione e la derivatizzazione del metaboloma sono state eseguite con il kit commerciale MetaboPrep GC (figura 7), in collaborazione con il produttore "Theoreo" srl, spin-off dell'università degli Studi di Salerno.



Figura 7. Kit commerciale MetaboPrep (Theoreo srl)

Questo kit commerciale è molto semplice e veloce, infatti l'estrazione del metaboloma avviene, generalmente, in meno di 30 minuti con elevata efficienza estrattiva e può essere utilizzato anche da personale non esperto. Il kit è stato specificamente progettato per le indagini di metabolomica non-target. Il metodo di analisi è stato adattato e validato secondo gli standard previsti dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 sui campioni di mozzarella di interesse del progetto.

In particolare, la fase di estrazione è stata modificata testando diverse combinazioni di temperatura e potenza del bagno ad ultrasuoni per ottimizzare la quantità di metaboliti

estratti, con un rumore di fondo post purificazione più basso possibile. Si è giunti quindi alla combinazione di irradiazione con una frequenza di 37kHz, una potenza di 180 W e una temperatura di 45°C. Una modifica è stata apportata anche alla fase di purificazione, andando ad aumentare la forza ionica della soluzione di ripartizione per mezzo dell'aggiunta di una soluzione acquosa di cloruro sodico al 5%.

In seguito all'estrazione, si è passati alla fase di analisi tramite GC-MS. La GC-MS è una tecnica analitica basata sull'utilizzo di un gascromatografo, che funge da separatore, accoppiato ad uno spettrometro di massa che, invece, viene impiegato per la fase di rivelazione. Per questo scopo, campioni da 2 µl della soluzione derivatizzata sono stati iniettati nel sistema GC-MS. Il sistema utilizzato per la prova è costituito da un gascromatografo GC-2010 Plus accoppiato a uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo Plus 2010 (Shimadzu Corp., Kyoto, Giappone). La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna capillare in silice fusa CP-Sil 8 CB da 30 m e 0,25 mm di diametro, con spessore del film pari a 1,00 µm (Agilent, J & W Scientific, Folsom, CA, USA), e come gas di trasporto (fase mobile) è stato utilizzato elio (He). La temperatura iniziale del forno di 100 ° C è stata mantenuta per 1 minuto e quindi aumentata di 6°C al minuto, per arrivare intorno ai 320°C con ulteriori 2 minuti di tempo di attesa. Il flusso di gas è stato impostato per ottenere una velocità lineare costante di 39 cm al secondo. Lo spettrometro di massa è stato impostato con ionizzazione a impatto elettronico (70 eV) in modalità di scansione completa nell'intervallo di 35-600 m/z con una velocità di scansione di 3333 amu/sec e un tempo dello sforzo di taglio del solvente di 4,5 minuti.

La durata totale del protocollo GC-MS è di circa 40 minuti. Grazie all'analisi GC-MS sono stati ottenuti cromatogrammi dei campioni di latte e mozzarella, come si può osservare in figura 8.

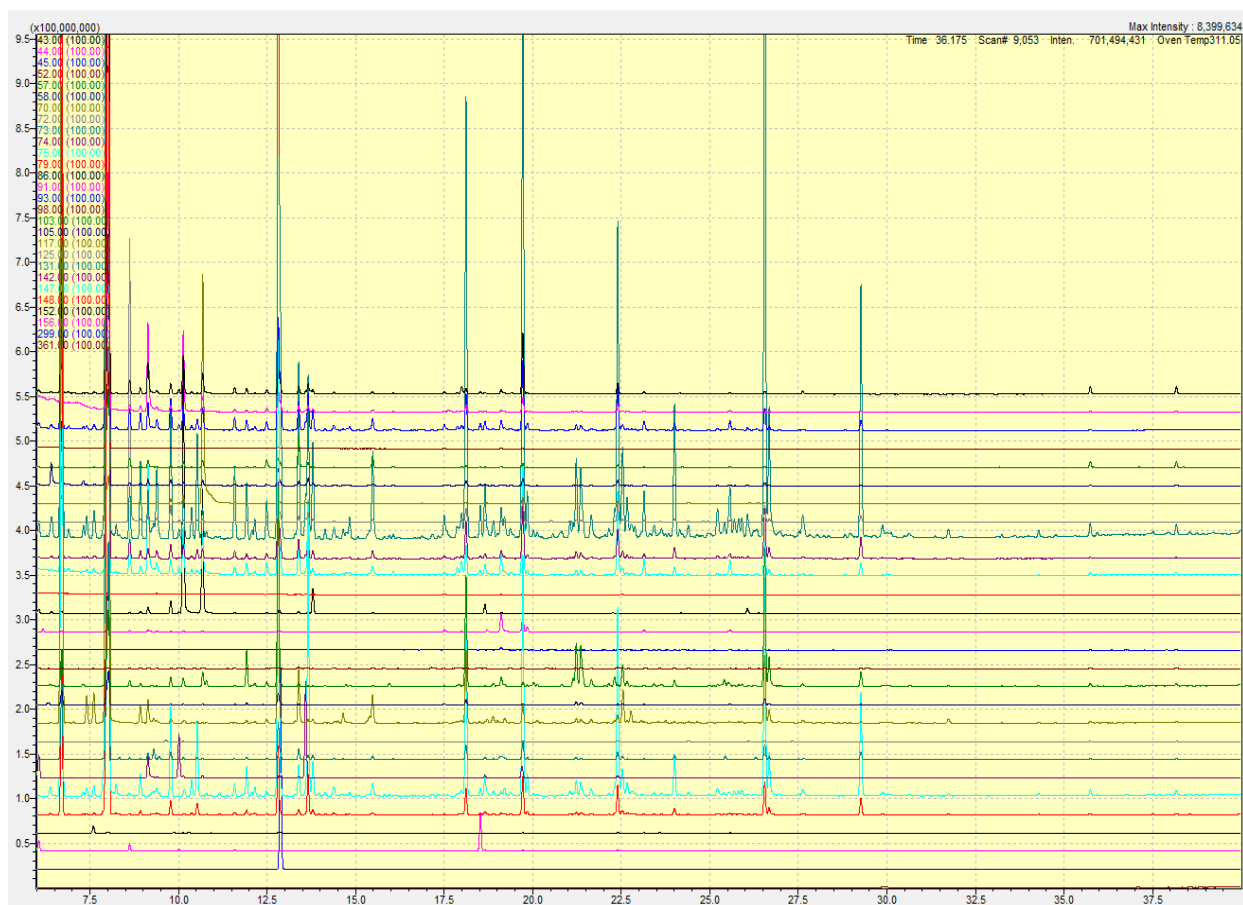


Figura 8. Cromatogramma di un campione di mozzarella.

Quindi, in seguito alla preparazione dei campioni, all'estrazione e alla fase di analisi, si è passati all'identificazione dei metaboliti, eseguita secondo Troisi et al (2017). In breve, i metaboliti non-target sono stati identificati comparando gli spettri di massa di ciascun picco con quelli presenti nella letteratura scientifica delle librerie del NIST14 (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

Al fine di migliorare il riconoscimento dei metaboliti, per mezzo di questo confronto, è stato predisposto un cromatogramma di una serie di idrocarburi lineari nell'intervallo C10-C34 per stimare l'indice di ritenzione lineare di Kovats, ovvero il valore che identifica i tempi di eluizione dei vari composti in GC, come mostra la figura 9.

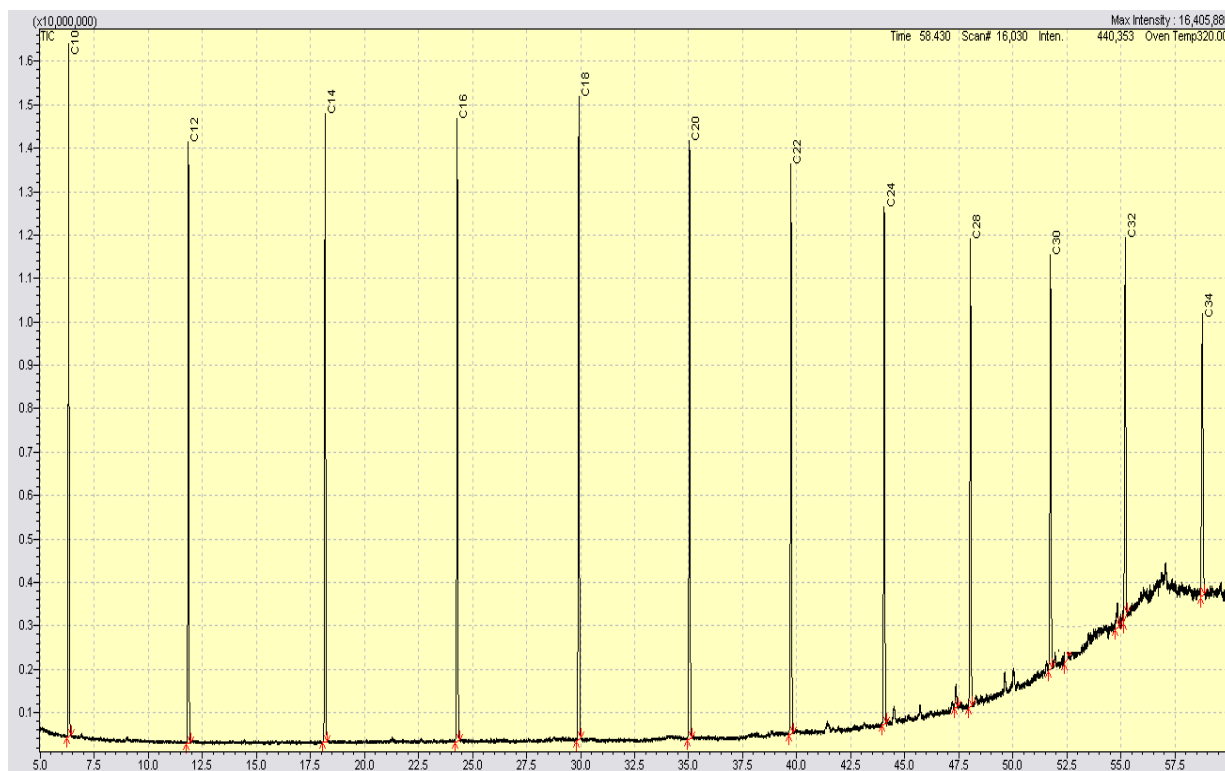


Figura 9. Indice di Kovats

La tolleranza massima della differenza dell'indice lineare è stata impostata su 10, mentre gli spettri minimi di corrispondenza secondo la ricerca bibliografica sono stati settati intorno all'85%, corrispondente al livello 2 di identificazione secondo la Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Sumner et al. 2007).

Non tutti i segnali spettrometrici sono stati analizzati. Infatti alcuni degli oltre 200 segnali per campione prodotti dalla GC-MS non sono stati ulteriormente studiati perché non presenti in modo coerente in altri gruppi di campioni, o per concentrazioni troppo basse o, ancora, per scarsa qualità spettrale che non permette di identificarli o confermarli come metaboliti. Fortunatamente, 185 metaboliti endogeni coinvolti nel metabolismo energetico, nel metabolismo dei lipidi e nel metabolismo degli aminoacidi sono stati rilevati sequenzialmente. I metaboliti emersi come i più rilevanti nelle classi di differenziazione, cioè i metaboliti con un punteggio VIP superiore a 1,5 sono stati ulteriormente confermati utilizzando standard analitici indipendenti esterni (livello MSI = 1). Per la parte dell'analisi statistica, i dati cromatografici sono stati

tabulati con una replica per riga e una variabile, rappresentata dall'area da un metabolita, per colonna.

Analisi statistica

L'elaborazione della matrice dei dati grezzi ha la funzione di pretrattamento dei dati al fine di normalizzare ciascuna area del picco del metabolita in quella dello standard interno, seguita dalla trasformazione generalizzata del logaritmo e dal ridimensionamento dei dati mediante la scalabilità automatica, che a sua volta è stata mediamente centrata e divisa per la deviazione standard di ciascuna variabile. L'analisi discriminante parziale quadrata (PLS-DA) (Wold et al. 2001) è stata eseguita utilizzando il pacchetto software statistico R (Fondazione per il Calcolo Statistico, Vienna, Austria).

Quindi la separazione di classe è stata ottenuta con l'analisi PLS-DA, un metodo supervisionato che utilizza tecniche di regressione multivariata per estrarre, tramite combinazioni lineari di variabili originali (X), le informazioni che possono prevedere l'appartenenza alla classe (Y). La regressione PLS è stata eseguita utilizzando la funzione `pls` presente nel pacchetto R `pls` (Mevik et al. 2007). La classificazione e la convalida incrociata sono state eseguite utilizzando la corrispondente funzione `wrapper`, sempre incluse nel pacchetto (Kuhn, 2008).

A seguire, è stato eseguito un test di permutazione per valutare il risultato della discriminazione di classe. In ogni permutazione, un modello PLS-DA è stato costruito tra i dati (X) e le etichette di classe permutate (Y) utilizzando un numero ottimale di componenti determinati dalla convalida incrociata per il modello, in base all'appartenenza di classe originale. Successivamente sono stati calcolati i punteggi di importanza variabile in proiezione (VIP) per ciascun metabolita. Il punteggio VIP è una somma ponderata dei quadrati dei carichi PLS, tenendo conto della quantità di variazione Y spiegata in ciascuna dimensione. Il punteggio VIP, in sintesi, è quindi espressione del grado di differenziamento di un metabolita rispetto ad un altro.

Risultati

Il principale obiettivo di questo lavoro è stato quello di identificare i marcatori metabolici che possano essere discriminanti per i prodotti caseari bufalini provenienti da diverse aree geografiche. Le aree geografiche considerate sono in particolare il Nord e il Sud Italia, in relazione alle aree zone presenti nell'areale della denominazione di origine protetta (DOP), situata prevalentemente al Sud Italia e in minor parte al Centro.

Come già accennato, con il cromatogramma sono stati rilevati 185 metaboliti endogeni differenzialmente espressi.

Le variazioni di concentrazione dei metaboliti tra i campioni di latte DOP e non DOP hanno permesso di dividere i metaboliti in due classi.

- CLASSE 1: metaboliti con concentrazioni più basse nella DOP (galattopiranoside, acido idrossibutirrico, acido citrico)
- CLASSE 2: metaboliti con concentrazioni più elevate nei campioni non DOP (talopirosio, acido pantotenico, mannobiosio, maltosio, mannofuranosio, acido dodecanoico, lattosio, acido palmitico, acido N-acetil glutammico, N-acetil glucosammina).

Tale suddivisione è stata riportata graficamente, considerando i metaboliti VIP, tramite la creazione box di colori diversi in base all'origine geografica dei campioni, supportati da un asse verticale (figura 10).

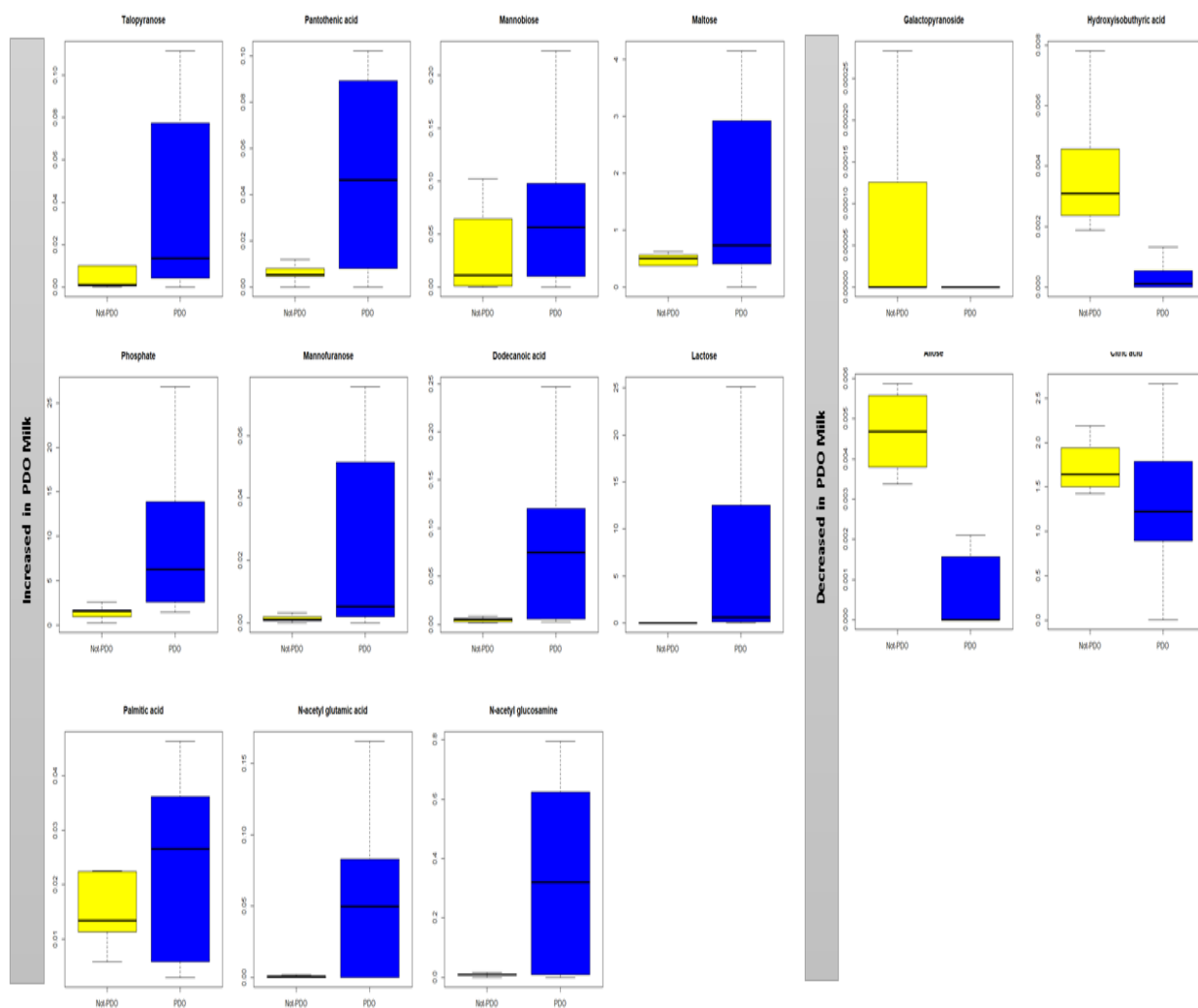


Figura 10. Rappresentazione grafica dei metaboliti VIP nei campioni di latte. I box in giallo rappresentano i campioni di latte provenienti dall'area non DOP, quelli in blu i campioni derivanti dal campionamento effettuato nell'areale DOP. L'asse verticale riporta i valori logaritmici normalizzati risultanti della GC-MS per ogni metabolita.

La stessa divisione è stata effettuata per i campioni di mozzarella (figura 11). Nello specifico:

- CLASSE 1: metaboliti quali talopiranosio, 2,3-diidrossipropilicoisanoato, sorbosio, acido 4-pneililglutammico, acido ossalico, galattosio, ecc sono risultati in misura maggiore nei campioni DOP;

- CLASSE 2: metaboliti quali tagatosio, acido lattico, ribitolo, dodeciltioglicolato, N-acetil glucosammina, valina, ecc sono risultati maggiormente presenti nei campioni prelevati nelle aree non DOP.

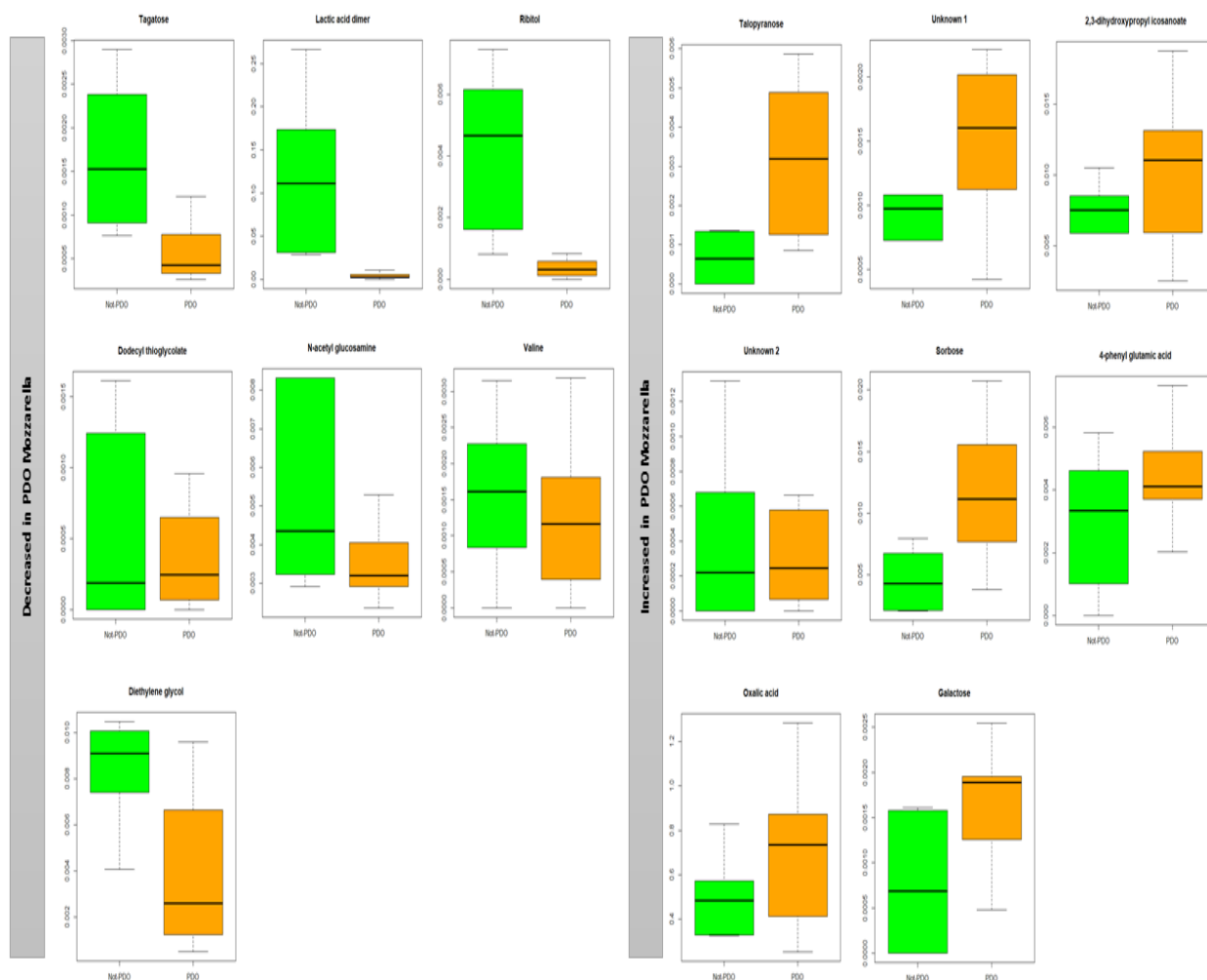


Figura 11. Rappresentazione grafica dei metaboliti VIP nei campioni di mozzarella. I box in verde evidenziano i campioni di mozzarella originari dell'area non DOP, quelli in arancio i campioni derivanti dall'areale DOP. L'asse verticale riporta i valori logaritmici normalizzati risultanti della GC-MS per ogni metabolita.

Dalla figura 12 è possibile comparare i metaboliti riscontrati nel latte di massa e nella mozzarella, in relazione alle diverse zone d'origine dei campioni, sia in base alla loro varianza, che in funzione del punteggio VIP. In particolare, in base ai punteggi VIP più elevati ($VIP \geq 1.5$) risaltano 15 metaboliti.

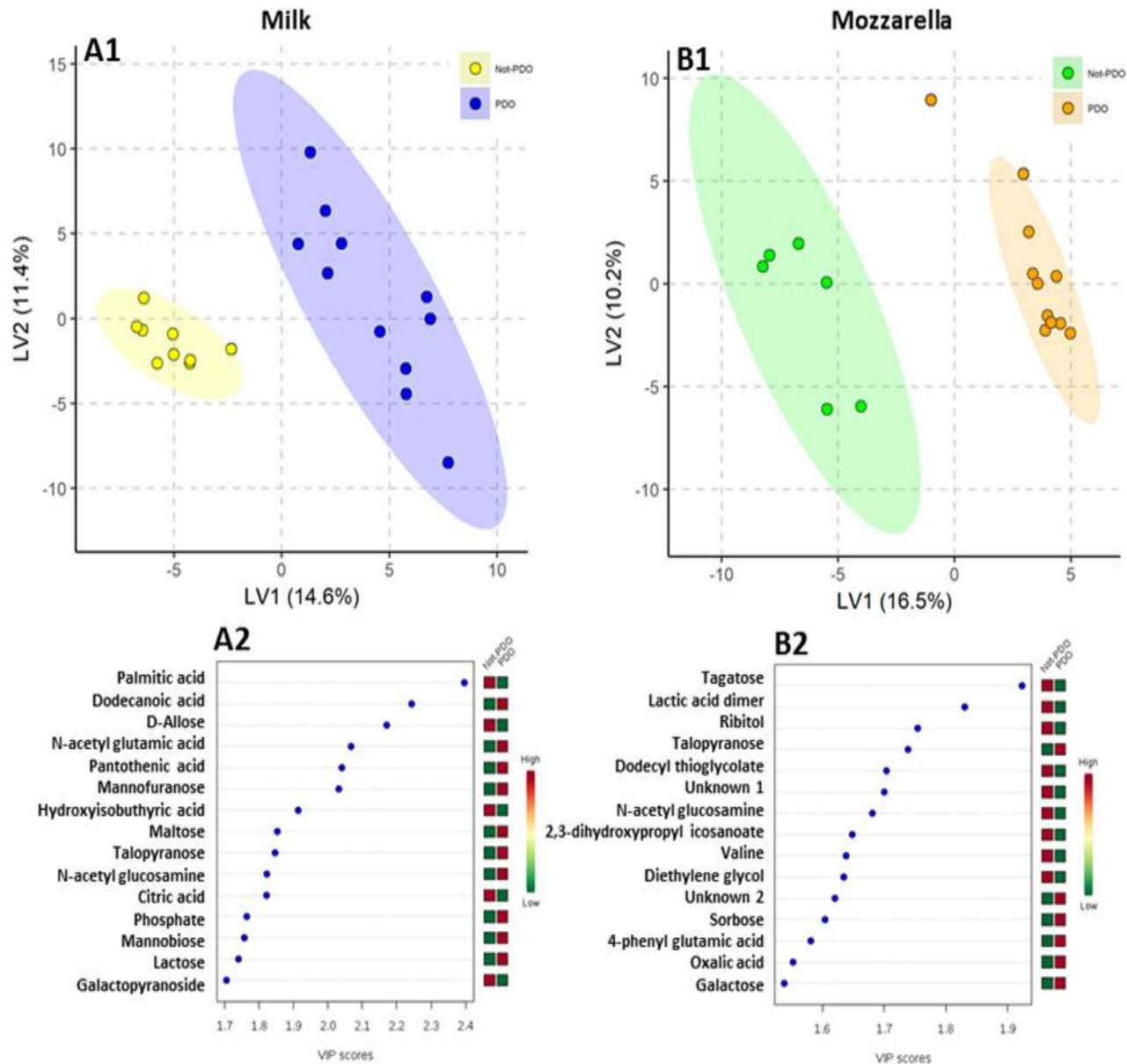


Figura 12. Modelli grafici di analisi discriminante parziale (PLS-DA) per differenziare i campioni di latte DOP e non DOP (A1) e Mozzarella (B1). La varianza di ciascun componente è indicata tra parentesi sull'asse corrispondente. I pannelli A2 e B2 mostrano i 15 metaboliti VIP con punteggio più alto ($VIP\text{-score} \geq 1,5$). Le caselle colorate sulla destra indicano la quantità relativa del metabolita corrispondente in ciascun gruppo in studio.

I 15 metaboliti VIP, non sono uguali per latte e mozzarella, ad eccezione del talopiranosio e del N- acetilglucosammina, come mostrato in modo più semplice e diretto in tabella 2.

Metaboliti in aumento LATTE	Metaboliti in aumento MOZZARELLA
Acido Palmitico (NON DOP)	Tagatosio (NON DOP)
Acido Dodecanoico (DOP)	Dimero dell'acido lattico (NON DOP)
D- Allosio (NON DOP)	Talopiranosio (DOP)
Acido N-acetilglutammico (DOP)	Dodecil-tioglicolato (DOP)
Acido Pantotenico (DOP)	Unknown 1 (NON DOP)
Mannosio (DOP)	N- acetilglucosammina (NON DOP)
Acido Idrossibutirrico (NON DOP)	2-3idrossipropionilcosanate (NON DOP)
Maltosio (DOP)	Valina (NON DOP)
Talopiranosio (DOP)	Dietilene (NON DOP)
N- acetilglucosammina (DOP)	Sorbosio (DOP)
Acido Citrico (NON DOP)	4-pentil acido glutammico (DOP)
Fosfato (DOP)	Acido Ossalico (DOP)
Mannobiosio (DOP)	Galattosio (DOP)
Lattosio (DOP)	Unkown 2 (DOP)
Galattopiranosio (NON DOP)	Ribitololo (NON DOP)

Tabella 2. Metaboliti VIP nei campioni di latte e mozzarella. In parentesi è indicata la zona in cui sono maggiormente espressi. Il talopiranosio è evidenziato in giallo e il N-acetilglucosammine in azzurro in quanto sono gli unici due metaboliti ad essere stati riscontrati in entrambe le tipologie di campione.

Discussione

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un approccio innovativo alla tracciabilità alimentare mediante un metodo di analisi che vede l'unione della gas-cromatografia (GC) e della spettrometria di massa (MS), per rilevare le differenze presenti nei profili metabolici del latte e della mozzarella di bufala, in relazione al luogo di origine degli animali allevati su tutto il territorio nazionale.

Questo studio ha cercato di dimostrare se, la combinazione di due metodi analitici, possa riuscire a fornire un approccio più sicuro e potente per le indagini di screening del latte e della mozzarella di bufala, al fine di tutelare il marchio della “Mozzarella di bufala campana DOP”. Dai risultati di questa prova è evidente una differenza esistente tra i metaboliti presenti sia nel latte che nella mozzarella derivanti da animali allevati nell'areale DOP e non DOP.

Prima di analizzare i vari metaboliti riscontrati, è importante specificare che il latte impiegato per la prova è stato latte di massa. La scelta del latte di massa non è casuale, bensì mirata ad evitare alterazioni o influenze sui risultati finali dovuti ai vari stati fisiologici dei singoli capi durante la produzione, come la gravidanza, i giorni di lattazione o l'ordine di parto.

Studiando i dati emersi dalla prova si è visto che, effettivamente, il luogo di origine dell'allevamento gioca un ruolo importante nella quantità e nella qualità dei metaboliti riscontrati in entrambe le matrici alimentari. È infatti plausibile che fattori quali il clima ed il suolo possano essere alla base di queste differenze, non tanto per i loro effetti sugli animali in sé ma sulla crescita, sulla qualità e sulla tipicità delle essenze foraggiere coltivate nelle aree di pertinenza. Inoltre anche la gestione alimentare dell'allevamento e lo stato generale della mandria sull'attività metabolica della ghiandola mammaria può avere un ulteriore effetto sulla produzione di latte, che si traduce poi nella trasformazione in mozzarella. È inoltre fondamentale osservare che, prima di entrare nel mercato, il latte viene generalmente sottoposto a trattamenti termici che possono modificare la composizione complessiva dei propri metaboliti. A tal proposito è stato osservato che il livello di monosaccaridi nel latte cambia a causa del trattamento termico (Mendoza et al. 2005) e varia anche durante lo stoccaggio (Troyano et al.

1996). Gli unici due metaboliti presenti sia nel latte di massa che nella mozzarella sono N-acetilglucosammina e il talopiranosio. Il talopiranosio è un precursore del talosio ed è stato evidenziato come “marker” differenziale del latte bovino rispetto a quello caprino in uno studio di Scano et al. (2014).

Partendo dall'analisi dei metaboliti nel latte, è noto che zuccheri, amminoacidi liberi, acidi organici e altri composti a basso peso molecolare compongono, generalmente, il pool di metaboliti del latte. Oltre ai principali nutrienti calorici, il latte contiene anche un'ampia varietà di composti bioattivi, come le immunoglobuline e altre proteine immunitarie, peptidi, nucleotidi, oligosaccaridi e metaboliti (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Sundekilde et al. 2013). Ad esempio, la concentrazione di acido palmitico, evidenziato nel latte con maggiore incidenza nell'area non DOP, dipende fortemente dal tipo di razione che viene formulata per l'animale. Studi condotti sulla bovina da latte hanno, infatti, messo in luce che diete più ricche di foraggi, tipiche di produzioni biologico/organiche, possono causare una potenziale modifica nella quantità dei substrati di acido palmitico nel rumine, che sono usati per la sua sintesi ex-novo nella ghiandola mammaria. Analisi effettuate da Stergiadis et al, (2018) hanno evidenziato una relazione negativa tra l'assunzione di foraggio fresco e la concentrazione di acido palmitico nel latte. Al contrario, ulteriori studi condotti in USA e in Olanda, hanno riportato una concentrazione dello stesso più elevata o nessuna differenza tra latte biologico e latte convenzionale. Queste discrepanze emerse nei vari studi condotti sulla bovina, sorgono probabilmente a causa delle variazioni delle diete utilizzate nei diversi paesi come risultato di quei fattori di cui si è già parlato in precedenza, quali terreno, clima, tradizione (Stergiadis et al. 2018).

Per quanto riguarda le concentrazioni di acido N-acetilglutammico, sappiamo che queste tendono ad aumentare a causa dell'accumulo di ammoniaca, quando viene incrementato il consumo di proteine (Hession et al. 2008). Ciò potrebbe essere dovuto ad una differenza tra la formulazione di razioni negli allevamenti ubicati nell'area DOP rispetto a quelli siti in altre zone della penisola. La maggiore espressione dell'acido N-acetilglutammico nel latte dell'areale DOP potrebbe essere quindi motivata dalla somministrazione di razioni più proteiche ed energetiche, formulate appositamente per gli animali le cui produzioni entrano nella filiera DOP, che sono inevitabilmente più

selezionati e con medie produttive più elevate. L'acido pantotenico (vitamina B5), maggiormente espresso nei campioni di latte delle zone DOP, è sintetizzato dal rumine. Tuttavia, la sintesi ruminale di questo composto non è sufficiente a soddisfare i fabbisogni degli animali, come è stato dimostrato nelle bovine che hanno produzioni molto spinte. Per tale ragione, risulta fondamentale l'aggiunta di integratori rumino-protetti (Wang C et al. 2017).

La presenza di acido pantotenico nel latte di massa potrebbe avere un impatto positivo in quanto, come è noto, questa vitamina è molto importante e benefica anche per la salute umana. Nei campioni di latte di massa provenienti dalle zone NON DOP, è risultata invece elevata la presenza di acido citrico, che secondo alcuni studi sulla vacca da latte, è negativamente correlato alla resa alla caseificazione (Larsen et al. 2014).

Nella mozzarella proveniente dall'area NON DOP, è stata riscontrata in discreta concentrazione la valina. La valina è un amminoacido essenziale e, insieme alla glicina, è il metabolita più espresso nel latte di capra, ricco di acidi grassi come quello bufalino. Potremmo dedurre che valina e glicina sono metaboliti tipici dei piccoli ruminanti, mentre il talosio o zuccheri simili, come il talopiranosio, sono marker per i grandi ruminanti, bufala compresa. Tuttavia è necessario incentivare nuovi studi per avere la certezza che questi metaboliti possano essere realmente marker specifici per le varie specie produttrici di latte, in modo da ottenere realmente un forte strumento di tracciabilità alimentare. Questo perché alcuni metaboliti differenziati durante la prova sono poco noti. Ad esempio i due metaboliti unknown 1 e 2 rilevati nella mozzarella, hanno piccato durante la gas-cromatografia ma non sono stati riscontrati equivalenti noti nella letteratura e sono risultati discriminanti, rispettivamente, nell'area NON DOP e in quella DOP.

Conclusioni

Negli ultimi anni, le scienze omiche hanno riscontrato grande successo nell'ambito scientifico. L'applicazione della metabolomica alla filiera bufalina ha aperto una innovativa ed ampia prospettiva di ricerca per questa specie di grande interesse zootecnico. L'utilizzo della suddetta disciplina omica in particolare potrebbe garantire, nel breve periodo, una più efficiente tracciabilità dei prodotti e, allo stesso tempo, un incremento produttivo della filiera. In questo modo si tutela sia il consumatore, che quindi ha la certezza di comprare esattamente ciò che è riportato in etichetta, sia il produttore che può vendere un prodotto di qualità con il cui ricavato può migliorare le performance riproduttive della mandria e ammortizzarne le spese.

In conclusione è possibile affermare che, nonostante l'esito positivo di questa prova, è doveroso sottolineare che dovrebbero essere effettuati ulteriori studi e sforzi riguardo l'applicabilità di un approccio metabolomico per scopi legali nella filiera bufalina e alimentare in generale, al fine di controllare e contenere le frodi alimentari di natura commerciale.

Bibliografia

- Álvarez B, Pascual-Alonso M, Rusu A, Bogason S, *A review on existing databases relevant for food fraud and authenticity*, Arch, Zootec. 2013, 62, 73–91.
- Caira S, Pinto G, Balteanu V, Chianese L, Addeo F. *A signature protein- based method to distinguish Mediterranean water buffalo and foreign breed milk*, Food Chem. 2013, 141, 597-603.
- Caira S, Pinto G, Nicolai M, Chianese L, Addeo F, *Simultaneously tracing the geographical origin and presence of bovine milk in Italian water buffalo Mozzarella cheese using MALDI-TOF data of casein signature peptides*, Anal. Bioanal. Chem. 2016, 408, 5609–5621.
- Cartoni F, Coccioli R, Jasionowska R, Masci M, *Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions*, J. Chromatogr. 1999, 846, 135-141.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluka, M. D., & Rodrick, G. E. *Metabolomic analysis in food science: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20, 557-566.
- Cubero-Leon E, Penalver R, Maquet A, *Review on metabolomics for food authentication*, Food Res. Int. 2014, 60, 95–107.
- Czerwenka C, Muller L, Lindner W, *Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of b-lactoglobulin variants*, Food Chemistry, 2010, 122, 901-908.
- Dalmaso A, Civera T, La Neve F, Bottero MT, *Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay*, Food Chem. 2011, 124, 362-366.
- Drivelos S and Georgiou C., *Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union*, Trends in Analytical Chemistry, 2012, 40, 38-51.

- Georgios P. Danezis, Aristidis S. Tsagkaris, Federica Camin, Vladimir Brusic, Constantinos A. Georgiou. *Food authentication: techniques, trends & emerging approaches*, Trends in Analytical Chemistry, 2016.
- Gerosa, S.; Skoet, J, *Milk a vailability: trends in production and demand and medium-term outlook*, FAO of the United Nations ESA Working paper 2012, 12-01.
- Hession AO, Esrey EG, Croes RA, Maxwell CA, *N-acetylglutamate and N-acetylaspartate in soybeans (Glycine max L.), maize (Zea mays L.), and other foodstuffs*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 19, 1921-1926.
- <https://www.mozzarelladop.it/>
- <https://www.vetinfo.it/>
- Kuhn M, *Building Predictive Models in R Using the caret Package*, J. Stat. Softw. Vol. 1 Issue 5, 2008.
- Larsen T, *Fluorometric determination of free and total isocitrate in bovine milk*, J. Dairy Sci. 2014, 12, 7498-7504.
- Mansor TTS, Che Man YB, Rohman A, *Applications of fast gas chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy for analysis of lard adulteration in virgin coconut oil*, Food Analytical Methods, 2011, 4, 365-372.
- Mazzei P, Piccolo A. *HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk*, Food Chem. 2012, 132, 1620-1627.
- Mendoza M. R, Olano A, Villamiel M. *Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks*, 2005, J. Agric. Food Chem.53, 2995–2999.
- Mevik BH, Wehrens R. *The pls Package: Principal Component and Partial Least Squares Regression in R*. J. Stat. Softw, Vol. 1, Issue 2, 2007.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F, *Sistematic functional analysis of the yeast genome*, 1998.
- Oms- Oliu G, Odriozola- Serrano I, Martin-Belloso O, *Metabolomics for assessing safety and quality of plant- derived food*, Food Research International, 2013, 54, 1172-1183.

- Pignata MC, Ferrão SPB, Oliveira CP, Faleiro AS, Bonomo RC, Silva WS, Rodrigues LB, de Albuquerque Fernandes SA, *Mechanical Parameters of the Mozzarella from Buffalo with Inclusion Levels of The Cow's Milk: Preliminary Study at the Lab Scale*, J. Bioanal. Biomed, 2015, 7, 1.
- Raynal-Ljutovac, K., G. Lagriffoul, P. Paccard, I. Guillet, and Y. Chilliard, *Composition of goat and sheep milk products*, 2008, An update. Small Rumin. Res. 79, 57–72.
- Russo R, Severino V, Mendez A, Lliberia J, Parente A, Chambery A, *Detection of buffalo mozzarella adulteration by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methodology*, J. Mass Spectrom. 2012, 47, 1407–1414.
- Sacco D, Brescia M A, Sgaramella A, Casiello G, Buccolieri A, Ogrinc, N. *Discrimination between southern Italy and foreign milk samples using spectroscopic and analytical data*, Food Chemistry, 2009, 114, 1559-1563.
- Scano P, Murgia A, Pirisi F, Caboni P, *A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk*, J. Dairy Sci. 2014, 10, 6057-6066.
- Singh P, Gandhi N. *Milk preservatives and adulterants: processing, regulatory and safety issues*, Food Rev Int. 2015, 31, 236–261.
- Singuluri H, Sukumaran M. *Milk adulteration in hyderabad, India – a comparative study on the levels of different adulterants present in milk*, J Chromatograph Separat Techniq. 2014, 5, 212.
- Stergiadis S, Bertiltz CB, Hunt B, Garg S, Ian Givens D, Kliem KE, *An update to the fatty acid profiles of bovine retail milk in the United Kingdom: Implications for nutrition in different age and gender groups*, Food Chem. 2018, 15, 218-230.
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW-M, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ, Viant MR, *Proposed minimum reporting standards for chemical analysis*

Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI), Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc. 2007, 3, 211–221.

- Sun, H. Z., D. M. Wang, B. Wang, J. K. Wang, H. Y. Liu, L. Guan le and J. X. Liu. *Metabolomics of four biofluids from dairy cows: potential biomarkers for milk production and quality*, J. Proteome Res. 2015, 14, 1287–12982.
- Sundekilde, UK, Larsen LB, Bertram HC, *NMR-based milk metabolomics*, NMR-based milk metabolomics. Metabolites, 2013, 3, 204–222.
- Tananaki C, Thrasyvoulou A, Giraudel JL, Montury M, *Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps*, Food Chemistry, 2007, 101, 1687-1693.
- Troisi J, Sarno L, Martinelli P, Di Carlo C, Landolfi A, Scala G, Rinaldi M, D'Alessandro P, Ciccone C, Guida M, *A metabolomics-based approach for non-invasive diagnosis of chromosomal anomalies*. Metabolomics, 2017, 13, 140, doi:10.1007/s11306-017-1274-z.
- Troyano E, Villamiel M, Olano A, J. Sanz,, Martinez-Castro I. *Monosaccharides and myo-inositol in commercial milks*, J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 815–817.
- Vaclavik L, Schreiber A, Lacina O, Cajka T, Hajslova J, *Liquid chromatography- mass spectrometry- based metabolomisc for authenticity assessment of fruit juices*, Metabolomics, 2012, 8, 793- 803.
- Wang C, Liu Q, Li HQ, Wu XX, Guo G, Huo WJ, Pei CX, Zhang YL, Zhang SL, *Effects of rumen-protected pantothenate supplementation on lactation performance, ruminal fermentation, nutrient digestion and blood metabolites in dairy cows*, J. Sci. Food Agric. 2018, 98, 2098-2121.
- Wold S, Sjöström M, Eriksson L, *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*, PLS Methods 2001, 58, 109–130, doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1.
- Woodcock T, Downey G, O' Donnell CP, *Near infrared spectral fingerprinting for confirmation of claimed PDO provenance of honey*, Food Chemistry, 2009, 114, 742-746.

- Xiao Y, Chen Q, Guang C, Zhang W, Mu W. *An overview on biological production of functional lactose derivatives*, Appl Microbiol Biotechnol. 2019, 103, 3683-3691.
- Xin H, Stone R. *Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine*, Science. 2008, 322, 1310–1311.