

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE E
ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
SEZIONE DI ISPEZIONE**

TESI DI DOTTORATO IN

**Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale
XVIII ciclo**

ELABORAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI PCR-REAL TIME

**PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE
NELLA MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA**

TUTOR

Dott.ssa Tiziana Pepe

CANDIDATA

Dott.ssa Isolina Di Marco

COORDINATORE

Prof.ssa M.L.Cortesi

INTRODUZIONE

La mozzarella di bufala è un formaggio fresco a pasta filata, caratteristica che in passato ne ha fortemente limitato la diffusione sul mercato. In seguito si sono intensificati i canali commerciali e parallelamente si è evoluta la tecnologia di produzione e mantenimento degli alimenti a temperatura controllata. Tali condizioni hanno permesso il diffondersi del prodotto a tutto il territorio nazionale ed all'estero, nella stessa misura di altri prodotti alimentari già da tempo affermati sul mercato.

L'aumento della domanda ha comportato mutamenti del ciclo di produzione della mozzarella, ne ha modificato in parte anche l'offerta con la comparsa di numerosi prodotti ottenuti anche con latte vaccino.

La contemporanea presenza sul mercato di numerosi prodotti lattiero-caseari del tipo fresco a pasta filata con denominazione di mozzarella e provenienti da allevamenti bovini e bufalini ubicati in numerose regioni d'Italia ha spinto le organizzazioni dei produttori tradizionali a rivendicare una politica di marchio.

Tale richiesta è stata accolta con il D.C.P.M. del 10/05/1993, che ha fissato i requisiti per la denominazione di origine controllata (D.O.C) per il formaggio dichiarato "mozzarella di bufala campana", il

quale deve essere realizzato con latte intero di sola bufala, prodotto e lavorato in allevamenti e caseifici ubicati prevalentemente nella fascia costiera della Campania (comuni della provincia di Napoli, Caserta, Salerno), e nel basso Lazio (comuni della provincia di Frosinone, Latina e Roma)

Nel 1996 (Regolamento CE n°1001 del 12/6/96), la Mozzarella di Bufala Campana ha ricevuto anche la tutela a livello comunitario mediante l'attribuzione della denominazione di origine protetta(D.O.P.).(43)

Il D.M. n° 97 A1233 del 10/02/97 ha stabilito, relativamente alla mozzarella non D.O.C. realizzata con latte di bufala, di riportare in etichetta assieme alla definizione generica di mozzarella, la dicitura "formaggio a pasta fresca filata prodotto con latte bufalino". Tuttavia il termine "mozzarella" è privo di tutela e può essere utilizzato liberamente anche per indicare formaggi freschi prodotti al nord con latte vaccino (sebbene la denominazione tradizionale di questi prodotti sia "fior di latte"). (14)

L'acquisizione del marchio e l'adozione del disciplinare di produzione sottopongono i produttori a sistemi rigidi di produzione finalizzati ad ottenere elevati standard di qualità del prodotto, che coinvolgono aspetti legati alla natura ed alla provenienza delle materie prime nonché alle tecniche di lavorazione.

Nel settore lattiero-caseario le principali frodi sono :

- L'utilizzo di latte in polvere e caseine nella produzione di formaggi, in particolare quelli freschi a pasta filata.
- La commercializzazione di formaggi a denominazione di origine controllata o tipici, privi di requisiti prescritti dai relativi disciplinari di produzione.
- La commercializzazione di latte fresco di provenienza estera contenente latte in polvere.

A tale proposito sono state effettuate numerose indagini volte alla verifica dell'utilizzo della caseina e dei caseinati nei formaggi freschi a pasta filata (Reg. CE n°2240/90). L'attività ispettiva è stata incentrata principalmente su formaggi di elevato pregio commerciale come i formaggi freschi a pasta filata ottenuta da latte di bufala.

Tali produzioni sono caratterizzate dalla qualità del latte utilizzato, dalla zona di origine e dalla particolare tecnica di produzione (9). Tali caratteristiche costituiscono un motivo di preferenza e di scelta da parte dei consumatori, sempre più attenti al livello qualitativo dei prodotti alimentari. Infatti, all'affermazione della mozzarella come componente della dieta quotidiana, hanno contribuito in modo determinante le sue qualità intrinseche, ovvero "l'insieme delle proprietà e delle

caratteristiche che influenzano l'accettabilità per il consumatore finale" (31), proprietà ben attribuibili ai prodotti lattiero-caseari. Infatti, tali prodotti sono attualmente percepiti dal consumatore come alimenti in sé sani e di elevato valore nutritivo.

In particolare, l'ampia versatilità di consumo, è funzionale ai tempi ed alle modalità di preparazione dei pasti, imposti dagli attuali ritmi di vita e di lavoro.

La Mozzarella di Bufala Campana per conservare il prestigio e il valore commerciale di un prodotto DOP deve conservare le caratteristiche di un alimento dalle qualità organolettiche superiori alla media dei prodotti industriali e sicuramente deve essere percepito come "genuino" nel senso proprio del termine.



CAPITOLO I

“LA BUFALA”

1.1 Storia della Bufala

Il bufalo italiano (*Bos Bubalus*) appartiene alla famiglia dei bovidi ed è originario dell'India orientale. Il suo nome deriverebbe dal latino parlato *Bufalum*.

Secondo alcuni questo animale fu introdotto in Italia in epoca longobarda, durante le invasioni barbariche del VI secolo. Secondo altri invece, furono i re normanni che, intorno all'anno 1000, dalla Sicilia, dove il bufalo era stato introdotto dagli arabi, lo diffusero in tutta l'Italia meridionale. Infine c'è chi sostiene l'origine autoctona di questo animale tanto che a sostegno di tale tesi, vi sono il ritrovamento di resti fossili nella campagna romana e nell'isola di Pianosa, nell'arcipelago toscano, ed i risultati di recenti studi che proverebbero una diversità filogenetica tra il bufalo italiano e quello indiano(12).

La diffusione della bufala nel nostro paese conosce un particolare sviluppo all'inizio del XI secolo, quando con l'impaludamento dei territori campani del basso Volturno e del Sele, i terreni assunsero le caratteristiche ambientali più adatte all'allevamento bufalino.

Tuttavia la scarsità di fonti bibliografiche, rende difficoltosa la trattazione dell'origine e della diffusione del bufalo in Europa e quindi nella nostra penisola, tuttavia, la presenza di questi animali in Italia può collocarsi in modo certo tra il XII e XIII secolo. All'inizio di questo millennio l'allevamento bufalino si sviluppò all'interno dei grandi ordini monastici, i quali durante il medioevo operavano attivamente nel campo agricolo e nell'allevamento; ne sono testimonianza alcuni documenti tra cui quello ritrovato nell'Archivio Episcopale del XII secolo intitolato **“il mazzone nell'antichità e nei tempi moderni”**, da cui si evince che il consumo dei formaggi bufalini in quell'epoca era entrato nel consumo sia ecclesiastico che laico.

Un'altra testimonianza si trova negli **“Acta Imperia Seculi XII e XIV”**, da cui apprendiamo che la valutazione commerciale del capo bufalino era superiore a quella del capo bovino(20).

Nel 1300 quindi, l'allevamento bufalino era una realtà economica ben radicata nel sud Italia, nello stato Pontificio e anche al di fuori del Lazio, tanto che intorno al 1360, a Roma, si hanno notizie di un regolamento che disciplinava il commercio di bufali e del cuoio bufalino. A partire da questo periodo, la bufala divenne la regina incontrastata delle zone paludose, quando all'impossibilità di coltivazioni, si unì la malaria, che

provocò lo spopolamento progressivo di questi territori da parte dell'uomo(36).

Il disordine idrogeologico e l'impaludamento di molte zone costiere della penisola, crearono le condizioni favorevoli alla diffusione dell'allevamento bufalino che cominciò la sua espansione in Campania, nel Lazio e nelle Marche (12).

I bufali erano animali forti e resistenti alle malattie, capaci di fornire anche in condizioni difficili, il proprio contributo al lavoro dell'uomo a costi quasi nulli.

I secoli XII e XIII testimoniarono una vera e propria svolta in questo tipo di settore agricolo in Italia. Nacque in tale periodo la figura del *bufalaro*, abituato ad allevare le bufale allo stato brado o semiselvatico, da utilizzare per arare i terreni compatti o come animali da soma nelle zone acquitrinose, dove i loro zoccoli lunghi e larghi assicuravano una salda presa.

Altra ricchezza di questi animali era la produzione di latte in abbondanza nei periodi invernali, dal quale si producevano formaggi, burro, ricotta e provole.

Nella seconda metà del millennio, l'allevamento bufalino divenne una realtà economica e sociale diffusa soprattutto nelle zone paludose dell'Italia centrale e meridionale.

L'allevamento era basato sulla transumanza e sull'aspetto del tutto selvatico del comportamento degli animali (20).

Tra il XVII e il XIX secolo l'allevamento delle bufale era diffuso saldamente in gran parte delle zone meridionali della penisola. Il latte che in principio era lavorato e trasformato in formaggi nello stesso posto in cui si effettuava la mungitura, a partire dal 1600 venne lavorato nelle “**bufalare**”, costruzioni in muratura di forma circolare con un camino centrale che permetteva sia di riscaldare il latte per la cagliata, sia di fornire acqua calda per il modellamento delle forme.

All'inizio del XIX secolo l'allevamento bufalino era ancora caratterizzato da sistemi di stabulazione primitivi; utilizzava infatti un sistema semiselvatico, che richiedeva investimenti, spese e rischi ridotti al minimo, generando una vera e propria fortuna per le regioni paludose che non avrebbero potuto trovare nessun'altra forma di sfruttamento e quindi reddito.

Nel XX secolo, con l'avanzare delle opere di bonifica, l'allevamento bufalino vide restringere il suo territorio, ma non modificò le sue caratteristiche semiselvatiche e primitive. Le prime innovazioni si ebbero solo con l'operatività della legge sulla bonifica integrale, la completa trasformazione avvenne grazie alle norme della riforma agraria delle terre incolte.

La bonifica dell' Agro Pontino, della Bassa Valle del Sele, del Volturno e delle altre zone d'Italia del periodo prebellico e la riforma agraria del secondo dopoguerra, restrinsero l'area d'allevamento delle bufale a limitate zone della Campania, del Lazio e della Puglia (12).

In quest'epoca l'allevamento ebbe una svolta decisiva di rinnovamento passando dalla tradizionale forma semiselvatica e itinerante, ad una compatibile con il nuovo assetto territoriale. Si andava così affermando l'allevamento moderno della bufala, dove oggi tecniche e macchinari sempre più moderni, ne fanno un settore all'avanguardia e pronto a nuove sfide e orizzonti.

Nel 1954 per la prima volta al mondo, una bufala fu munta con una mungitura automatica e attualmente dopo 50 anni i progressi della tecnica e le nuove scoperte nel campo della microbiologia, hanno permesso di dotare gli allevamenti di apparecchiature sofisticate che permettono di abbattere la carica microbica nelle fasi di mungitura e di lavorazione del latte.

Oggi al pari dei più moderni sistemi di allevamento bovino gli allevamenti bufalini sono dotati di un sistema di riconoscimento del bestiame rappresentato da una targhetta riportante un numero a quattordici cifre, imposto dall'anagrafe dell'Unione Europea, e altre due, rispettivamente con il numero aziendale e il numero del libro genealogico (36).

Nel corso del tempo quindi, le tecniche di allevamento e di trasformazione si sono molto evolute e oggi l'allevamento delle bufale è un settore in grande espansione. Gli animali sono tenuti in una forma di allevamento stabulato, costituiti da paddocks con laghetti artificiali e tettoie necessarie per proteggerli dalla calura estiva. Le bufale pascolano in un regime di semilibertà e i rigidi controlli sanitari mantengono gli allevamenti indenni da malattie come la brucellosi e la tubercolosi, in modo da poter lavorare il latte crudo senza sottoporlo a pastorizzazione.

Tale strategia consente di lavorare il latte senza alterare la flora microbica specifica responsabile dell'aroma e del gusto del principale prodotto derivato: la mozzarella.(5)

Nell'ultimo decennio l'allevamento bufalino ha subito un notevole incremento a livello mondiale e ancora di più a livello nazionale se paragonato ai dati relativi all'allevamento bovino.

Notoriamente l'allevamento bufalino trova diffusione nelle aree a clima caldo umido ed in particolare in Asia, in Africa ed in America Latina. I paesi dove maggiormente sono presenti gli allevamenti sono: India, Pakistan, Cina, Thailandia ed Egitto. La consistenza mondiale nel 1997 ammontava a 166.66milioni di capi. Il paese dove si trovava la maggiore consistenza era

l'India (55.32%), seguita dalla Cina (14.11%). Dal 1991 il patrimonio è aumentato del 10.98%. Il paese che è stato caratterizzato dalla maggiore crescita è il Pakistan (23.47%). I motivi che stanno alla base dell'allevamento di questa specie sono sia la produzione (latte, carni, pelli, ecc), sia il lavoro. I paesi dove l'allevamento bufalino è finalizzato alle produzioni sono India, Pakistan ed Egitto; mentre trova ampia diffusione per il lavoro in Cina.

La crescita del patrimonio ha determinato in Italia un aumento del numero medio di capi per azienda. Infatti, si passa dai 12.7 capi per azienda nel 1961 ai 26.3 capi per azienda del 1970 ed infine ai 40.1 capi del 1990. Il principale motivo della crescita del patrimonio bufalino, soprattutto nelle zone pianeggianti, va individuato nei notevoli cambiamenti che hanno interessato la tecnica di allevamento di questa specie che attualmente è quasi simile a quella del bovino da latte.(10)

Attualmente la popolazione bufalina mondiale è stimata in oltre 170 milioni di capi, con un incremento del 10.3% rispetto a dieci anni fa, quando i capi raggiungevano i 155 milioni di unità. Parallelamente la produzione latte è passata da circa 48 milioni di tonnellate nel 1993 a circa 172 milioni di tonnellate nel 2003, con un aumento di oltre 50% in dieci anni.(25)

L'Italia detiene in Europa il maggiore patrimonio bufalino con un incremento progressivo di circa 55.000 capi nel periodo 1991-1997 (da 95.000 a 150.000).

La crescita del patrimonio ha determinato in Italia un aumento del numero medio di capi per azienda. Infatti, si passa dai 12,7 capi per azienda nel 1961 ai 26,3 capi per azienda del 1970 ed infine ai 40,1 capi del 1990.

Il principale motivo della crescita del patrimonio bufalino, soprattutto nelle zone pianeggianti, va individuato nei notevoli cambiamenti che hanno interessato la tecnica di allevamento di questa specie che attualmente è quasi simile a quella del bovino da latte.(10)

Lo sviluppo dell'allevamento bufalino è legato soprattutto alla forte richiesta della mozzarella di bufala, con un passaggio da dai 101 mila capi nel 1993 ai 265 mila capi nel 2003 con un aumento di oltre 164%.

Questo ha consentito un aumento della produzione lattea in dieci anni pari quasi al 178% arrivando ad una produzione di 238.5 mila tonnellate annue.

A conferma di questi dati vi è il forte incremento della produzione di mozzarella di bufala campana che nel 2003 ha raggiunto le 28.2 tonnellate.

La produzione di latte da parte della bufala si prolunga per l'intero corso dell'anno, tuttavia, se si considera la sua distribuzione mensile, si nota che la sua disponibilità

aumenta nei mesi autunnali ed invernali e diminuisce notevolmente in quelli estivi o comunque molto caldi(20).

Questo fenomeno è causa del ciclo di riproduzione della bufala, che trova le condizioni più favorevoli per la sua riproduzione nel semestre agosto-febbraio. Poiché il periodo medio di gravidanza è di 310 giorni, risulta che i parti si concentrano prevalentemente nel semestre giugno-dicembre, cosa che spiega l'aumento delle disponibilità di latte nella stagione autunnale ed invernale.

A questo proposito riferendoci ad un generico allevamento in cui non venga operato alcun intervento per distribuire meglio la produzione del latte possiamo dire che una mandria di 120 bufale, produce mediamente 2.160 quintali di latte all'anno e 6 quintali di latte al giorno e presenterà una produzione giornaliera latte di 7.2 quintali nel periodo di dicembre-gennaio e di 2.9 quintali nel mese di giugno (circa 7-8 litri di latte al giorno per capo). (1)

Questo andamento della produzione, determina gravi problemi ai produttori in quanto la richiesta di mozzarella di bufala da parte dei consumatori, mostra un andamento inverso rispetto a quello osservato per la produzione di materia prima. Per ovviare a questo inconveniente, si è cercato di operare la

destagionalizzazione dei parti. A tale fine si cerca di intervenire specialmente sulle manze, in quanto il loro periodo riproduttivo è facilmente influenzabile.

Tuttavia, nonostante si siano sviluppate delle tecniche vantaggiose per la destagionalizzazione e garantire il parto in primavera, è emerso come questa tecnica costituisce ancora un grosso ostacolo. A tale problema infatti se ne aggiunge un altro, che ne è una diretta conseguenza, la composizione del latte di bufala subisce durante il periodo di lattazione alcune importanti modifiche, per cui gli allevamenti in cui più spicca la stagionalità forniscono all'inizio dell'autunno un latte che provenendo da animali all'esordio della lattazione, mostra una resa di caseificazione sensibilmente più bassa della media. (50)



1.2 Patrimonio bufalino nell'area D.O.P

Il territorio interessato dalla D.O.P. nel 1990 comprendeva l'84.58% delle aziende bufaline e l'88.70% dei capi presenti a livello nazionale. All'interno di questi territori la provincia con il maggior numero di aziende è Caserta (46.37%), seguita da Frosinone (24.93%) e Latina (15.84%). I capi invece sono concentrati per il 60.84% nella provincia di Caserta e per il 19.50% in quella di Salerno.

La zona della provincia di Caserta interessata dall'allevamento è la Piana del Volturno ed in particolare i comuni di Cancellò ed Arnone, Grazzanise, Castel Volturno e Santa Maria la Fossa.

Il numero medio di capi per azienda è di 55.17%.

In provincia di Frosinone l'allevamento si concentra nei comuni collinari di Amareno e Villa Santo Stefano (83.43% delle aziende e 89.38% dei capi). Il numero medio di capi per azienda è di 11.5%. In provincia di Latina il patrimonio è concentrato in due aree "limitrofe", una di collina (Monti Ausoni, Lepini ed Aurunci) e l'altra di pianura (Agro Pontino).

In provincia di Salerno l'allevamento bufalino ha radici antiche, riconducibili alla Piana del Sele e ai territori limitrofi. Da questi dati emerge che la crescita del comparto si è realizzata prevalentemente nelle aree dove

la specie è da tempo presente, mentre modesta è stata la sua diffusione in nuovi territori. (10).

CAPITOLO II

‘IL LATTE’

2.1 Il latte di bufala e il latte vaccino

Il latte di bufala ha un sapore dolce e un colore bianco opaco, dovuto all'assenza di carotenoidi. Il pH oscilla tra i valori di 6.6-6.8, con percentuali di grasso tra il 6 e il 9 %, con prevalenza di acido oleico tra gli insaturi e di quello palmitico tra i saturi. Le sostanze azotate variano tra il 3.8-4% e il lattosio tra il 4.5-5%.

Le principali differenze tra il latte di bufala e il latte vaccino sono di natura chimico fisica e più precisamente nel contenuto in lipidi e proteine, infatti nel latte vaccino la percentuale media di grassi e proteine è rispettivamente di 3.3% e 2.7% contro i 7.5% e 4.4% in quello bufalino (vedi tab.1)(1)(36).

Questi diversi valori nei due tipi di latte contribuiscono a dare al prodotto “mozzarella” una tipica consistenza, ma soprattutto conferiscono una maggiore resa alla trasformazione, ossia da un quintale di latte di bufala si ottengono 24Kg di mozzarella rispetto ai 13 Kg ottenuti da un quintale di latte vaccino.

Per ottenere un chilo di mozzarella di bufala servono circa quattro litri e mezzo di latte e poiché alla

mungitura di una bufala si ottengono circa 12 litri di latte al giorno è facile calcolare che ogni animale da la possibilità di produrre solo 3 chili di mozzarella al giorno.

Tab. 1

%	Latte vaccino	Latte bufalino
Acqua	88	82.2
Densità (15°C)	1.029	1.031
Ph	6.29	6.45
Acidità	10.57	10.12
Grasso	3.32	7.51
Residuo secco	11.46	17.6
Ceneri	0.7	0.82
Proteine totali	2.75	4.42
Caseina	2.11	3.37
Lattosio	4.52	4.69
Cloro (NaCl)	0.136	0.108
Calcio (Ca ⁺⁺)	0.117	0.199
Fosforo (P)	0.088	0.124

2.2 Aspetti microbiologici del latte

Altro aspetto della tipicità del latte bufalino è strettamente legata alla sua natura microbiologica.

In condizioni normali infatti, nel latte di bufala sono presenti alcuni ceppi di lactobacilli in concentrazioni superiori rispetto a quelli presenti nel latte di vaccino. Quindi l'attività metabolica di questi batteri risulterebbe responsabile per la maggior parte del sapore e dell'aroma di questo tipo di formaggio, ed influirebbe sul fenomeno dell'acidificazione della cagliata durante la trasformazione.(5)

2.3 Processo di caseificazione

La caseificazione è un meccanismo che regola la coagulazione delle proteine del latte e si basa essenzialmente sulla modificazioni enzimatica da parte della chimosina, contenuta nel caglio, della k-caseina che è una proteina contenuta nel latte che precipita in presenza di calcio.

L'intero processo può essere sintetizzato in quattro passaggi essenziali. Il primo è identificato come *fase enzimatica*, in cui avviene l'attacco dell'enzima sulla k-caseina ad una temperatura ottimale di 40°C.

Nel secondo passaggio noto come *fase di coagulo*, non è necessaria la presenza dell'enzima come nella prima fase, ma è indispensabile la presenza di calcio e fosforo

solubili che vengono fissati sul complesso fosfo-paracaseinato di calcio. Se in questa fase la temperatura scende al di sotto dei 15°C, si rischia di rallentare eccessivamente il processo e apparentemente il latte non caglia più. La terza fase è nota come *sineresi*, in cui si verifica la contrazione del reticolo formato dalle proteine coagulate che racchiude i globuli di grasso e in questa fase si ha la separazione del siero. L'ultima fase è nota come *proteolisi*, ed è il passaggio maggiormente responsabile di modificazione del gusto e della struttura della cagliata, in quanto avvengono modificazioni profonde che caratterizzano il sapore finale del prodotto e che corrispondono alla maturazione della proteina ed alla liberazione di sostanze più o meno sapide e aromatiche.

La degradazione della caseina è dovuta essenzialmente ai microrganismi che si sviluppano, ed in minima parte agli enzimi proteolitici del latte e del caglio (5). Per ottenere un prodotto con qualità organolettiche costanti, è essenziale standardizzare il rapporto grasso/proteine del latte di lavorazione.

Nei diversi periodi della lattazione si osservano nel latte di bufala ampie oscillazioni nel contenuto di grasso, mentre il contenuto di proteine resta relativamente costante.

Ciò comporta una grossa variazione del rapporto grasso/proteine: gli effetti di tale fenomeno possono risentirsi in fase di trasformazione. Se il livello del grasso nel latte è elevato e non è bilanciato da proporzionali quantità di proteine caseificabili, si possono avere sensibili perdite di grasso sia nel siero che nell'acqua di filatura.

Poiché il livello medio di proteine nel latte di bufala è intorno a 4.3-4.7 %, ne consegue che il contenuto di grasso nel latte, che assicura una buona riuscita del prodotto, dovrebbe essere intorno al 7%. Invece sia che i parti siano concentrati in un solo periodo dell'anno (ciclo tradizionale), sia che siano scaglionati lungo tutto l'anno (ciclo modificato), il contenuto di grasso nel latte di bufala è generalmente superiore al 7%(23).

Con tale percentuale di grasso si ottiene un formaggio con titolo di grasso superiore a quello minimo richiesto dal Decreto di Riconoscimento della Denominazione di Origine, fissato al 5.2% di grasso sulla sostanza secca.

2.4 Storia della mozzarella nel tempo

La mozzarella è il più noto formaggio a pasta filata prodotto in Italia. Ottenuta sia da latte vaccino che da latte di bufala rappresenta il 20% della produzione casearia totale ed il suo consumo è in continua crescita.

La mozzarella ha una storia antica, risalente al Medioevo. La zona di origine è individuata nella pianura napoletana, dove mandrie di bufale producevano un latte molto bianco e le condizioni primitive della produzione del latte e dei trasporti permettevano che giungesse ai luoghi di lavorazione già molto inacidito, determinando così le proprietà plastiche della cagliata.

Il nome deriva probabilmente dal verbo “*mozzare*” che vuol dire tranciare e fa riferimento all’operazione di tranciare, con le mani, un pezzetto di pasta grande quanto un pugno dal lungo nastro di pasta filata precedentemente prodotto.

Il consumo di latticini bufalini risale al XII secolo (8). Già allora, infatti, i monaci del monastero di San Lorenzo di Capua, usavano offrire una “mozza o provatura” con un pezzo di pane, ai componenti del Capitolo che si recavano presso di loro, ogni anno in processione (2). Inizialmente, però, sembra che venissero prodotte più che altro ricotte e provole, queste ultime pure affumicate, per permettere una maggiore conservazione e il trasporto anche in zone lontane.

In origine la mozzarella nacque come sottoprodotto della preparazione della provatura/provola, in quanto era difficile da conservare e commercializzare date le peculiari caratteristiche di freschezza e per la sua deperibilità e forse per questi motivi veniva prodotta in

scarsa quantità ed era destinata solo ad un numero ristretto di consumatori. Potrebbe essere questa una delle ragioni dell'assenza di questo latticino e non della provola, negli antichi presepi napoletani, nei quali gli elementi gastronomico-alimentari sono messi in grande rilievo e rispecchiano le tradizioni del popolo napoletano (11).

Se inizialmente il consumo della mozzarella era limitato alla zona di produzione, dalla seconda metà del '700 essa comincia ad essere sempre più presente sui mercati di Napoli, forse per la benefica influenza dell'impianto della Tenuta di Carditello, in provincia di Caserta. Questa infatti dette un contributo non indifferente all'incremento della produzione, commercializzazione e consumo di questo latticino.

La diffusione della mozzarella, comunque, va di pari passo con l'accrescimento delle vie di comunicazione.

Per questo con l'unificazione d'Italia, si venne a creare tra Napoli e Caserta, ad Aversa, la famosa "Taverna", che era una specie di mercato all'ingrosso delle mozzarelle e delle ricotte di bufala che stabiliva quotidianamente le quotazioni in rapporto alla produzione e alla richiesta.

Attualmente il maggior consumo della mozzarella prodotta con solo latte di bufala si riscontra nelle zone prossime ai luoghi di produzione. Nei piccoli caseifici la

commercializzazione avviene prevalentemente sul mercato provinciale; per i caseifici medio grandi prevale la commercializzazione sul mercato nazionale. I caseifici della provincia di Caserta destinano il 48.55% della loro produzione al mercato nazionale, quelli di Salerno invece per il 51.60% al mercato provinciale. Infine, va detto che la quantità prevalente di mozzarella DOP esportata sui mercati esteri è prodotta in provincia di Caserta. Va ricordato, inoltre, che proprio la grande distribuzione ha favorito un' eccessiva concorrenza non solo con la diffusione della mozzarella vaccina, ma anche con la produzione di prodotti succedanei. Questa problematica è particolarmente sentita nelle aziende del Casertano e più in generale di quelle di piccola dimensione.(10)

Gran parte del latte di bufala trasformato dai caseifici rilevati (circa l'87%), è destinato alla produzione della Mozzarella DOP realizzata prevalentemente nel periodo estivo. (10)

Oggi sono presenti sul mercato diversi tipi di mozzarella:

1) *Mozzarella di Bufala Campana* (riconosciuta DOP con il DPR 10.5.93)

1) *Mozzarella di Bufala*

2) *Mozzarella con solo latte vaccino*

3)Mozzarella con latte misto Il latte di bufala destinato a questo tipo di prodotto è pari all'11.40% di quello totale lavorato. La provincia di Caserta con circa 40 mila quintali di latte bufalino annuo è quella che detiene la percentuale più alta di latte bufalino destinato alla produzione della mozzarella mista.(10).

2) **Mozzarella da “pizza”** che, se venduta e dichiarata come tale, deve avere le caratteristiche della mozzarella in ovuli, ma una minore umidità (dal 15 al 20% sul totale). Se non si tratta di mozzarella, ma di preparazione fusa o mista, non può essere venduta con il nome di mozzarella.

La Mozzarella di bufala, riconosciuta DOP con la denominazione di “**Mozzarella di Bufala Campana**”, è ottenuta esclusivamente con latte di bufala intero ed è prodotta in Campania (province di Benevento, Caserta, Napoli, Salerno) e nel Lazio (provincia di Frosinone e Latina) (16).

Si può presentare in forma sferoidale di colore bianco-latte, leggermente elastica nelle prime otto -dieci ore dopo la produzione ed il confezionamento, successivamente tende a divenire più fondente; priva di difetti quali occhiature, con superficie liscia e consistenza morbidissima.

Ha un tenore in lipidi su sostanza secca, minimo del 52% con elevato contenuto di acido linolenico. Un'umidità massima del 65%, ed un pH=5.1-5.6.

Al fine di ottenere una mozzarella di buona qualità è necessario:

- che il latte venga munto in maniera razionale ed igienica
- che venga consegnato al caseificio entro la sedicesima ora dalla mungitura,
- che posseda un titolo in grasso minimo del 7%
- che sia opportunamente filtrato e riscaldato ad una temperatura tra 33°C e 36°C.

2.5 Prospettive di sviluppo del mercato

Le vendite del prodotto di bufala sono considerevolmente cresciute, ma in misura che può essere giudicata inferiore a quanto ci si sarebbe potuto attendere. La forte crescita che si è avuta negli ultimi anni nell'offerta di latte e di prodotto trasformato impone che i mercati di sbocco del prodotto finito siano altrettanto crescenti. Si pone quindi l'esigenza di adottare specifiche strategie di sviluppo per la trasformazione della mozzarella di bufala, che sembrano interessare due obiettivi differenti.

- 1) Da una parte le imprese trasformatrici dovranno continuare a puntare su ben precise nicchie di

mercato, nelle quali offrire una merce di qualità elevata, costante facilmente riconoscibile dai consumatori, di aspetto semi-artigianale.

2) Dall'altra parte le imprese più dinamiche ed ambiziose dovranno puntare a collegarsi con la distribuzione moderna e con mercati geograficamente più lontani.

Un'attenzione particolare deve essere riservata alle relazioni che possono stabilirsi tra la mozzarella di bufala, intesa come prodotto tipico con alte potenzialità di sviluppo, e le moderne strategie della Grande Distribuzione Organizzata. (13).

CAPITOLO III

“LA LAVORAZIONE”

3.1 Tecnologia della lavorazione:

Possiamo distinguere le fasi di lavorazione della mozzarella in:

a) *Coagulazione del latte*

Viene preceduta dall'aggiunzione di siero-innesto (2%) che apporta una sufficiente dose di acido lattico ed una certa carica della microflora specifica nel prodotto finale.

Aggiunto il caglio liquido e mescolata la massa a mezzo della “rotella” si ottiene la coagulazione in meno di un'ora a temperature di 33°C-36°C.

Esistono due tipi di coagulazione : la coagulazione acida e quella enzimatica. Il primo tipo di coagulazione porta alla formazione di una cagliata poco elastica e con poca coesione, utilizzata prevalentemente per i formaggi caprini e per il mascarpone. La coagulazione enzimatica o presamica, invece, si ottiene per l'azione dell'enzima chinasi aggiunta al latte con il caglio, che porta ad una cagliata elastica, consistente e non demineralizzata con uno spurgo uniforme.

Il grasso inglobato durante la coagulazione della cagliata, dopo le operazioni di rottura, passa nel siero che verrà utilizzato nella produzione del giorno dopo.

b) Spurgo e rottura

A coagulazione avvenuta si effettua la rottura della cagliata, la quale può essere fatta manualmente con un “ruotolo” di legno o con uno spino metallico (fig. n. 1) fino ad ottenere grumi caseosi delle dimensioni di una nocciola (3-6cm).

Molta cura viene posta nelle modalità di rottura della cagliata. Quasi sempre la rottura comporta perdita di grasso del siero (fino all'1%). Queste perdite possono essere limitate ricorrendo ad un'agitazione lenta con lame o fili metallici sottili. La rottura può anche essere effettuata con eliche collegate a motori elettrici a velocità regolabile o, più comunemente, in caldaie polivalenti con attrezzi a velocità programmabile.



Foto n. 1

I caseifici che dispongono di caldaie polivalenti hanno sostituito la lavorazione manuale artigianale.

La rottura della cagliata favorisce lo spurgo che sarà tanto maggiore quanto più energica è l'azione meccanica. Lo spurgo consiste nella separazione del siero dalla cagliata.

c) *Maturazione e filatura*

Dopo la rottura, la cagliata viene lasciata ad acidificare prima sotto siero. Dalla caldaia di coagulazione, viene estratto circa il 60% del siero e una parte di esso (circa il 5% del siero totale) viene riscaldato e aggiunto dopo circa 5-10 minuti in caldaia in modo da mantenere la temperatura della massa intorno ai 46°C. Nel ciclo di lavorazione artigianale l'acidificazione dura 3-4 ore, raramente arriva a protrarsi fino a otto ore.

La maturazione della pasta va sorvegliata attentamente, perché deve essere colto il momento giusto della filatura. Il grado di maturazione si ha quando un campione di pasta, immerso per breve tempo in acqua bollente, si lascia tirare facilmente in "fili" lunghi e consistenti (foto n.2). La determinazione del momento giusto per l'estrazione della pasta dal siero è di fondamentale importanza per la preparazione di mozzarella di buona qualità: se infatti la pasta è troppo matura, si ottiene un formaggio molto compatto e granuloso, se è acerba è difficile da filare e produrrà un latticino dilavato, parzialmente sgrassato e duro.

Foto n.2



Alcuni tecnici giudicano matura la pasta quando essa viene spontaneamente a galla sul siero che la contiene ed in cui fermenta. La pasta matura viene estratta dal siero, sbriciolata con le dita e posta in recipienti bassi e larghi detti “compecine”. Ricoperta di acqua bollente viene fatta girare lentamente usando la “rotella” per far saldare i grumi caseosi. Quindi mediante un manico di legno corto detto “jorio” la massa viene ridotta in cordoni. La temperatura nel corso di questa operazione è mantenuta

elevata, versando ripetutamente acqua bollente nella “compecina”. Il liquido risultante prende il nome di “acqua bianca o cizza”.

La pasta filata viene quindi più volte ripiegata su se stessa. Dopo aggiunta di acqua fresca, si formano i “pezzi” che vengono ulteriormente suddivisi per dare origine alla mozzarella.

d) *mozzatura*

La fase di mozzatura viene effettuata manualmente da due operatori, di cui uno “mozza” con il pollice e l’indice delle due mani dei pezzi di pasta filata da una massa globosa di 3-4 Kg, l’altro operatore invece, mantiene la pasta.

Oggi i caseifici possiedono anche formatrici meccaniche, con le quali vengono ottenute pezzature più piccole di 20-30-50-100g.

Nell’ultima fase il prodotto appena formato viene fatto cadere in vasche contenenti acqua fredda e successivamente passato in salamoia.

e) *salatura*

La salatura viene realizzata immergendo il formaggio in soluzioni saline a diversa concentrazione, tipicamente con un contenuto di sale che varia tra il 10-18% (foto n. 3). La durata di tale operazione in genere non supera le 10 ore per le pezzature di 400-500 g.

Durante la permanenza del formaggio in salamoia, il sale penetra per diffusione. Pertanto la velocità con cui il sale penetra nel formaggio dipende dalla concentrazione salina della salamoia, dalla temperatura e dalle dimensioni della mozzarella.

Una volta estratta dalla salamoia e immersa nel liquido di governo la sua concentrazione tende a riequilibrarsi. Infatti dagli strati più esterni in cui la concentrazione è molto alta, il sale migra verso quelli interni.



Foto n. 3

f) *Affumicatura*

Nel disciplinare si cita: “...il prodotto può essere affumicato solo con procedimenti naturali e tradizionali: in tal caso la denominazione di origine deve essere seguita dalla dicitura *affumicata*”

La mozzarella di bufala affumicata, chiamata comunemente “provola affumicata”, prevede un passaggio del prodotto in una salamoia al 10% e un trattamento fumigante. Nella pratica artigianale sul fondo di un recipiente cilindrico si produce la combustione incompleta di paglia di grano, mediante soffocamento della fiamma. Il fumo investe il prodotto, sospeso mediante bastoni o dispositivi analoghi, sulla sommità del bidone affumicatore e determina l'imbrunimento della crosta della mozzarella. Il colore passa dal bianco-porcellana ad un giallo dorato-scuro e la pasta assume un sapore caratteristico e gradevole di affumicato (foto n.4).

Foto.4



Secondo il decreto Ministeriale del 7/4/1998 (15), il prodotto denominato “Mozzarella di Bufala Campana” deve essere commercializzato in confezioni su cui figurino un apposito contrassegno che utilizzi i seguenti i riferimenti colorimetrici:

1) parte superiore, sole a raggiera:rosso composto da 79% Magenta e 91% Giallo

2) parte inferiore, campo verde, composto da 91% Cyan e 83% Giallo, con la dicitura Mozzarella di Bufala Campana di colore bianco ad eccezione del nome “Campana”di colore verde.

3) parte centrale recante la testa di Bufala, di colore nero.

Il contrassegno è parte integrante delle norme di designazione che ne prevedono l’utilizzo esclusivamente con la dicitura “Mozzarella di Bufala Campana”, immediatamente seguita dalla menzione “denominazione di origine protetta” (15) e, come già detto, da quella “affumicata” nel caso del prodotto sottoposto al trattamento con fumo.



CAPITOLO IV

“LA NORMATIVA”

4.1 Attività legislativa prima del riconoscimento del marchio D.O.P

La necessità di provvedere alla tutela di alcuni formaggi tipici è stata avvertita sin dagli inizi degli anni 50. Infatti, risale a questo periodo l’emanazione della legge n.125 del 10/04/1954.

Questa legge è stata di notevole importanza per la valorizzazione di formaggi tipici, in quanto ha permesso di salvaguardare i prodotti attraverso il riconoscimento della denominazione di origine.

In particolare, all’art.2 viene sancito che la “Denominazione di Origine” può essere assegnata a formaggi prodotti in zone limitate geograficamente e realizzati osservando usi e consuetudini locali che maggiormente influenzano le caratteristiche merceologiche del prodotto. La stessa legge prevede la costituzione di due organismi: il Comitato nazionale e il Consorzio volontario dei produttori.

Il Comitato nazionale ha i seguenti compiti: provvedere alla realizzazione del riconoscimento della denominazione, essere collegato agli organi competenti ai fini di reprimere eventuali trasgressori della legge e

infine esercitare la funzione arbitraria in caso di contenzioso tra le parti in causa.

Il Consorzio deve assicurare l'azione di vigilanza sull'applicazione della legge.(10)

4.2. Il Consorzio di Tutela

Il Consorzio per la tutela del formaggio Mozzarella di Bufala Campana, è stato costituito nel 1993 al fine di valorizzare in tutto il mondo questo prodotto tipico e genuino ottenuto tramite un'accurata lavorazione artigianale. Esso promuove ogni iniziativa a salvaguardarne la tipicità, le peculiari caratteristiche, l'uso della denominazione ed a favorirne il costante miglioramento delle tecniche di produzione, esercitando una costante azione di vigilanza sulla produzione e sul commercio della Mozzarella di Bufala Campana nel rispetto del disciplinare di produzione del DOC (DPCM 10/05/93) e del DOP (regolamento CE n°1107 del 12/06/96). (1)

Inoltre l'attività specifica va identificata nei rigorosi controlli, eseguiti allo scopo di verificare che la mozzarella di bufala, prodotta nel circuito DOP, sia conforme al regolamento che non tollera l'impiego neanche in minime percentuali, di latte diverso da quello bufalino (9).

Il Consorzio, dunque si occupa della valorizzazione e promozione del prodotto e svolge assistenza alle aziende associate a riguardo di leggi e regolamenti presso allevatori, trasformatori, produttori.

4.3 Frodi alimentari

Il disciplinare di produzione della mozzarella di bufala campana prevede per la sua fabbricazione l'utilizzo esclusivo di latte di bufala. In tale evenienza rimane escluso un impiego parziale di latte bovino o di altra specie. La miscelazione del latte bovino o di altre specie animali, di qualità e valore inferiore con quello bufalino costituisce non solo una frode commerciale infedele, ovvero la consegna ad un acquirente di un prodotto alimentare di qualità o di natura diversa da quella pattuita, ma comporta anche la possibile induzione di patologie allergiche di varia gravità, che possono essere eliminate solo evitando la fonte responsabile della reazione allergica.

Le frodi commerciali sono punibili ai sensi degli art. 513 e 515 del Codice Penale.

Il processo di fabbricazione della mozzarella consente di utilizzare fraudolentemente sostanze come:

1) *lattoproteine (caseine e caseinati)*

L'utilizzo è consentito previa autorizzazione per la sola preparazione dei formaggi fusi in quantità non superiori

al 5% (Reg CE 2204/90). Questi derivati proteici del latte ottenuti in particolari condizioni di temperatura, tempo, pH e acqua libera, favoriscono la formazione della lisinoalanina (LAL) . La frode può essere evidenziata in quanto le proteine naturali del latte non contengono molecole tipo LAL che sono amminoacidi innaturali del latte e che derivano dalla reazione tra residui di lisina e deidroalanina a sua volta derivante dalla defosforilazione della fosfoserina. Pertanto, la determinazione del livello di LAL è importante per la ricerca di caseine e caseinati nei formaggi.

2) *Latte in polvere*

E' vietato dalla legge 138/74 che detta norme concernenti il divieto di ricostituzione di latte in polvere destinato alla trasformazione casearia; tale frode si svela con la ricerca della furosina mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, in sistema isocratico secondo il D.M. 15/12/2000. la furosina, presente in piccola quantità nei prodotti a base di latte crudo, raggiunge valori elevati in quelli ottenuti con latte in polvere o sottoposti ad altri trattamenti. Attraverso il test della furosina, si può individuare l'impiego fraudolento di latte liofilizzato in quello liquido nella preparazione della mozzarella di bufala. Il valore massimo di

furosina ammesso per ogni 100g di sostanza proteica è di 12mg.

3) *Antimicrobici e sbiancanti*

Vengono usati fraudolentemente dagli operatori del settore antimicrobici e sbiancanti che non sono esplicitamente previsti nel disciplinare UE della Mozzarella di bufala campana e pertanto in contrasto sia con la normativa nazionale, Legge 125 del 1954, sia CE Reg n.2081/1992. Tra gli antimicrobici abbiamo la formaldeide, anche se oggi è adoperato soprattutto il lisozima il quale viene aggiunto al latte per ovviare al difetto del gonfiore precoce causato dai colibatteri, specie nei mesi estivi. L'impiego di detto additivo costituisce una pratica estranea alla tecnica tradizionale locale di lavorazione della mozzarella di bufala campana in quanto per il suo effetto "antibiotico" viene ad incidere negativamente sulla microflora autoctona del latte di quel determinato territorio.

Infatti il lisozima influisce sui batteri anticaseari e sulla microflora lattica.

Il perossido di benzoile serve a mascherare l'aggiunta di latte bovino di colore bianco giallognolo al latte bufalino di colore bianco niveo. L'effetto del prodotto deriva dalla sua capacità di scindersi nel latte, liberando acido benzoico e perossido di idrogeno, che

agisce come forte ossidante e quindi sbiancante anche per effetto della distruzione delle molecole di carotenoidi e di vitamina A.(13)

CAPITOLO V

“METODOLOGIE ANALITICHE”

5.1. Metodi di rilevazione delle frodi

Un metodo di laboratorio che consente di evidenziare la presenza di latte di altre specie è la focalizzazione isoelettrica (IEF) delle caseine trattate con plasmina su gel di poliacrilammide. (Reg CE 1081/96 abrogato dal Reg. 213/2001) Il metodo evidenzia reazione positiva per il latte bovino, anche sottoforma di tracce.

E' da ritenersi che la presenza di tracce di latte bovino (% < 10 %) in mozzarella di pura bufala, possa ricondursi a fenomeni di cross-contaminazione durante la fase di lavorazione in caseifici che trasformano sia latte vaccino che latte bufalino.

La valutazione viene eseguita sui profili γ_3 γ_2 caseina per confronto del profilo del campione con quelli ottenuti sullo stesso gel da standard di riferimento contenenti lo 0 e l'1% di latte vaccino. La caseina del latte vaccino deve essere rivelabile con l'opportuna sensibilità anche dopo i lunghi periodi di maturazione consueti in commercio.

Altri metodi per l'identificazione del latte si basano sull'analisi della frazione proteica e quindi sulla ricerca di frazione omologhe di proteine sia a livello di frazione

caseinica sia di quella siero-proteica. I principi analitici si fondono sul riconoscimento delle λ s1 caseine tramite elettroforesi per verificare l'origine e la natura delle stesse, e pertanto sulla diversa mobilità elettroforetica di proteine omologhe dei latti delle due specie. Tali differenze sono dovute a sostituzioni amminoacidiche determinate da variazioni di natura genetica. E' possibile mettere in evidenza anche piccole quantità di latte bovino in miscela con quello di bufala in campioni di mozzarella facendo ricorso alla cromatografia liquida ad alta prestazione delle proteine del siero del formaggio solubile a pH 4.6.(Reg.CE/92)

Poiché il latte bovino contiene una frazione siero proteica β -lattoglobulina variante A, assente nel latte di bufala, è possibile distinguere fino all'1% di latte bovino nella mozzarella di bufala campana.

I metodi di ricerca basati sull'analisi delle caseine risultano più affidabili di quelli che considerano le proteine del siero. Le caseine risultano particolarmente stabili al calore mentre le proteine del siero del latte risultano più facilmente denaturabili e perciò più difficilmente rilevabili nei casi particolari di energici trattamenti termici per il risanamento del latte.(13)

Inoltre la variabilità dei dati tra i laboratori è superiore a quella all'interno di uno stesso laboratorio, poiché possono essere commessi errori sistematici, non

sempre facili da individuare. Uno dei più frequenti è la non accuratezza della concentrazione dello standard di riferimento.

5.2 Tecniche di biologia molecolare

Le tecniche di biologia molecolare hanno trovato negli ultimi anni una sempre più vasta applicazione nell'identificazione di specie negli alimenti di origine animale.

Studi specifici sono stati condotti per gli alimenti a base di carne, pesce e derivati del latte. In particolare la PCR trova un sempre più ampio utilizzo nel controllo delle frodi dei prodotti lattiero caseari protetti dal marchio DOP.⁽⁶⁾ Tra questi la mozzarella di bufala campana è sicuramente tra i prodotti maggiormente a rischio di adulterazione per l'impiego, durante il processo di lavorazione, di latte di specie diversa da quella indicata dal disciplinare, a tale proposito il più utilizzato è il latte vaccino.

Il disciplinare di produzione di questo formaggio fresco tipico dell'Italia meridionale, consente la produzione della mozzarella esclusivamente da latte di bufala e specifica le metodiche ufficiali utilizzate per controllare e rilevare le possibili sofisticazioni dovute dall'aggiunta di latte di valore nutrizionale ed economico inferiore. Tali metodi sono l'HPLC (GU

della Repubblica Italiana 11 Giugno 1996 n. 135) e l'IEF su poliacrilammide delle caseine dopo plasmolisi (Reg. CE 213 /2001).

Il riscontro di latte diverso da quello contemplato nel disciplinare di produzione è reato di particolare gravità e si configura la frode in commercio. Entrambe le tecniche sopra menzionate, per quanto specifiche e sensibili, soffrono di tempi di esecuzione abbastanza lunghi, non consentono di analizzare un grosso numero di campioni contemporaneamente, e spesso necessitano di apparecchiature costose e sofisticate. Allo scopo di ovviare agli inconvenienti citati, numerosi autori (6) hanno fatto ricorso alla biologia molecolare, le preferenze sono state orientate verso la tecnica PCR End-Point. Tuttavia bisogna considerarne alcuni limiti applicativi, primo fra tutti la PCR tradizionale è un test qualitativo che non consente di effettuare una valutazione quantitativa del DNA di partenza.

Paradossalmente la sua estrema sensibilità può anche rappresentare un limite, in quanto la tecnica mette in evidenza anche solo tracce di DNA di specie diversa magari dovute a contaminazioni minime ed accidentali (anche in termini dello 0.5%) lungo la filiera, dal campo allo stabilimento di produzione passando per il trasporto e lo stoccaggio. Al fine di ovviare all'impossibilità di stabilire esattamente in termini

percentuali, il quantitativo di latte aggiunto fraudolentemente, presso il nostro laboratorio è stato messo a punto un protocollo di PCR “Real Time” allo scopo di rendere rapidi, attendibili e quantificabili i risultati ottenuti. In attesa, quindi, che ci sia un riconoscimento ufficiale della validità della PCR real time, possiamo affermare che la PCR end Point alla luce dei risultati ottenuti da vari autori e dall’esperienza applicativa maturata presso il Centro di Referenza Nazionale, si candida a buon diritto quale metodo di routine o di screening per la ricerca di latte bovino nelle produzioni bufaline protette dal DOP. Eventuali campioni non conformi individuati da tale test, andrebbero esaminati con la isoelettrofocalizzazione allo scopo di stabilire l’esatta percentuale di latte aggiunto.

5.3 PCR

Il più comune metodo di ricerca in grado di produrre un numero elevato di copie di una specifica sequenza di DNA senza doverla clonare è la Polymerase Chain Reaction (PCR). Ideata da Kary Mullis alla metà degli anni '80, rivoluzionò la genetica molecolare rendendo possibile un tipo di approccio del tutto nuovo per lo studio e l’analisi dei geni.

Questa tecnica è altamente sensibile e specifica, in quanto permette la sintesi *in vitro* di segmenti di DNA bicatenario e l'amplificazione della sequenza target milioni di volte in poche ore; per questo motivo viene anche definita "amplificazione genica".

La reazione di amplificazione parte dalla capacità enzimatica della DNA polimerasi I di sintetizzare un secondo filamento partendo da un DNA stampo denaturato. In particolare, la miscela di reazioni deve comprendere i quattro desossiribonucleotidi, opportune concentrazioni saline e pH, oligonucleotidi che funzionano da inneschi o "primer" per l'attività enzimatica. Tipicamente, si utilizzano forme di DNA polimerasi termostabili, quali la Taq polimerasi, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, che consentono di organizzare la reazione in ripetizioni cicliche. La reazione a catena della polimerasi si compone tipicamente di 30-50 cicli, ognuno dei quali presenta tre step:

1. Denaturazione (denaturation): il DNA bicatenario viene scisso in due filamenti monocatenari separati mediante riscaldamento a temperature vicine ai 94°C.
2. Fase di attacco (annealing): i due primers (oligonucleotidi specifici che vengono sintetizzati in laboratorio, grazie alla conoscenza della

sequenza bersaglio) si legano alle porzioni di DNA monocatenario a loro complementari, mediante la formazione di legami a idrogeno.

3. Fase di allungamento (elongation): la Taq polimerasi si lega in corrispondenza dei primers ed utilizza i nucleotidi liberi per completare la sintesi, determinando così la polimerizzazione di nuove catene complementari.

Il principale criterio che determina la specificità della PCR è la scelta dei primers. Per assicurare l'unicità di amplificazione di una sequenza, il primer dovrebbe avere una lunghezza media vicina a 20 paia di basi (4). Primers troppo corti, infatti, sono poco specifici avendo alte probabilità di trovare diverse zone di complementarietà nel genoma.

Altri criteri influenzano la funzionalità di un primer, quali i rapporti adenina/timina (*A/T*) e guanina/citosina (*G/C*), la presenza di sequenze ripetute o complementari (28). Attualmente l'ottimizzazione delle sequenze oligonucleotidiche da utilizzare come primer per la PCR può essere facilitata dall'uso di appropriati programmi software (35).

Altri criteri metodologici per la realizzazione di un test di PCR, sono l'ottimizzazione dei diversi parametri della reazione di amplificazione, quali la concentrazione del DNA stampo, dei primers, dei sali, del numero di cicli e

della temperatura di annealing (51) (37) (32). È infatti importante l'uso di reagenti e protocolli standardizzati per la riproducibilità dei test di PCR (34).

La qualità del DNA presente nei campioni modificati è particolarmente importante per l'analisi dei campioni. La lunghezza media dei frammenti di DNA presenti nel campione prova è un importante parametro di qualità del DNA; infatti è essenziale che la dimensione media dei frammenti di DNA nel campione non sia significativamente più piccola della sequenza bersaglio nell'analisi.

La degradazione del DNA presente nel campione da testare, nel caso specifico di alimenti, dipende soprattutto dai processi chimici, fisici o enzimatici che esso subisce durante la trasformazione tecnologica. Le metodiche di estrazione devono inoltre assicurare l'assenza di inibitori della PCR (28).

5.4 Sviluppi della PCR quantitativa

La reazione a catena della polimerasi (PCR), a partire dalla sua introduzione nel 1985, è il metodo correntemente utilizzato per l'amplificazione di acidi nucleici ed ha assunto un ruolo di preminenza nella diagnostica medica e nell'analitica in generale (47). Tuttavia, le caratteristiche stesse della reazione di amplificazione non ne consentono un utilizzo per la quantificazione della sequenza target

presente inizialmente nel campione (24). Infatti, possono influenzare notevolmente i prodotti finali della reazione, piccole differenze nell'efficienza di amplificazione, quali la qualità e la concentrazione della Taq polimerasi, dei dNTPs, del $MgCl_2$, dei primers e dei cicli della reazione. Altre variabili imprevedibili, essenzialmente legate alla qualità del DNA stampo, possono alterare il risultato finale dell'amplificazione (22).

Il crescente interesse nelle applicazioni quantitative della PCR ha quindi favorito la proposta di diversi tipi di saggi (38).

La PCR quantitativa è una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi che è in grado di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico (38). In particolare la PCR quantitativa competitiva e la PCR Real Time hanno trovato numerose applicazioni, in primo luogo nell'ambito della diagnostica medica, con recenti applicazioni nelle indagini analitiche degli alimenti.

La necessità di adeguarsi alle direttive legislative europee ed italiane, che prevedono, per la Mozzarella di Bufala Campana, l'obbligo di rispettare i criteri relativi alla lavorazione di tale prodotto, ha reso necessario la predisposizione di metodiche analitiche in grado di rilevare la presenza in termini percentuali, di componenti non previste dal disciplinare.

5.5 PCR Quantitativa Competitiva (QC-PCR)

Le prime tecniche analitiche sviluppate in questo senso hanno sfruttato la tecnica della PCR quantitativa competitiva (QC-PCR), che ha consentito di raggiungere, fino all'introduzione della PCR Real Time, le migliori prestazioni in termini di sensibilità, precisione, accuratezza e specificità nella quantificazione degli acidi nucleici degli organismi più svariati. Il mantenimento di tali caratteristiche è però assicurato solo da una precisa esecuzione di numerose repliche delle misurazioni del campione e da una intensa manipolazione successiva alla PCR, con conseguenti forti svantaggi in termini di tempi e costi di esecuzione.

Il principio della QC-PCR si basa sulla co-amplificazione di un DNA standard e di un DNA target (26)(39)(48). Il DNA standard deve avere caratteristiche tali da essere il più vicino possibile al target come dimensioni e struttura chimica. La sequenza nucleotidica da utilizzare come standard deve essere quindi costruita in modo tale da essere distinguibile dalla sequenza target, ma con caratteristiche di amplificabilità equivalenti, utilizzando lo stesso paio di primer rispetto al target. Classicamente, il DNA standard è quindi costituito da un plasmidio linearizzato che porta un' inserzione o una delezione di basi o una mutazione puntiforme.

Dopo QC-PCR, i prodotti di amplificazione sono separati

attraverso elettroforesi su gel di agarosio, gli ampliconi ottenuti a partire dalle sequenze target e standard sono distinguibili per il diverso peso molecolare. La quantificazione del DNA target è ottenuta per confronto dell'intensità della banda ottenuta dopo elettroforesi rispetto alla banda corrispondente all' amplicone standard. Al punto di equivalenza le concentrazioni di partenza dei DNA standard e target sono uguali: questo permette di risalire alla concentrazione iniziale del DNA target, essendo quella del DNA standard nota.

5.6. PCR Real Time

L'evoluzione della tecnica di PCR proposta dal saggio TaqMan permette oggi una drastica riduzione dei tempi di esecuzione e del materiale consumato utilizzando un solo strumento ed eliminando completamente l'impiego di reagenti radioattivi o tossici. Comparato alle PCR tradizionali, il test non solo mantiene spiccate caratteristiche di sensibilità, ma garantisce anche decisivi miglioramenti in termini di specificità, di precisione e di intervallo di quantificazione del campione incognito. Questi vantaggi sono dovuti all' innovativo sistema di rilevamento e misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato, che consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che

rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati (27).

La prima determinazione in tempo reale dei prodotti di PCR è stata effettuata da Higuchi et al. (1992), con un sistema che includeva bromuro di etidio in ogni ciclo d'amplificazione, una fonte di raggi ultravioletti che irradiava i prodotti d'amplificazione ed una CCD camera che catturava l'emissione di fluorescenza, successivamente elaborata attraverso un software dedicato a rilevare la quantità di DNA target.

Con l'evolversi dei cicli la concentrazione degli amplificati aumenta, con conseguente incremento dell'emissione di fluorescenza. Rappresentando in un sistema di assi cartesiani le intensità di emissione in ascissa e il numero dei cicli in ordinata, si ottiene una curva che fornisce informazioni sulla quantità di DNA stampo originariamente presente nella reazione con un' approssimazione minore rispetto a quella derivabile da una PCR end point.

Un ulteriore progresso verso lo sviluppo degli attuali sistemi si è in seguito avuto con l'evolversi della "chimica" della reazione. Intercalanti quali il bromuro di etidio hanno infatti il limite della aspecificità: si legano infatti sia ai prodotti d'amplificazione specifici, sia ad eventuali ampliconi aspecifici che vengono generati durante la reazione di PCR. In alternativa il saggio 5'

nucleari da la possibilità di rilevare i soli prodotti specifici d'amplificazione. Tale saggio è stato per la prima volta proposto da Holland et al.(30), che dimostrarono come l'attività 5' nucleasica della Taq DNA polimerasi potesse essere utilmente sfruttata per la determinazione dei soli prodotti target. In aggiunta ai classici componenti di una reazione PCR, tale saggio comprendeva una sonda marcata con ³²P all'estremità in 5' e bloccata all'estremità in 3' in modo tale da non poter funzionare da primer. Durante l'amplificazione, l'appaiamento della sonda alla sua sequenza target generava un substrato che veniva distrutto dall'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi quando l'enzima copiava il secondo filamento a partire da un primer disegnato a monte della sonda. A reazione PCR terminata, la quantità di sonda degradata veniva terminata attraverso cromatografia su strato sottile.

Un ulteriore avanzamento della metodica analitica si è avuto ad opera di Lee et al. (33), che hanno eliminato la necessità di determinare la quantità di sonda degradata attraverso analisi post-PCR.

Questi autori hanno infatti realizzato un tipo di sonda caratterizzata da un oligonucleotide dotato sia di un fluorocromo reporter che di un quencher. Quando la sonda è integra, la vicinanza tra il reporter e il quencher riduce la fluorescenza emessa a causa della legge di Forster.

Nell'attuale PCR Real Time con sonde tipo TaqMan l'estensione dei primer durante la reazione PCR produce fluorescenza, come schematizzato in figura 5. Se infatti la sequenza target è presente nella miscela di reazione, la sonda TaqMan si appaia a valle del sito di attacco del primer e durante l'estensione dei primer, viene degradata dall'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi.

Tipicamente, una sonda TaqMan contiene FAM (6-carboxyfluorescein) come reporter fluorescente legato covalentemente all'estremità in 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) legata covalentemente all'estremità 3'.

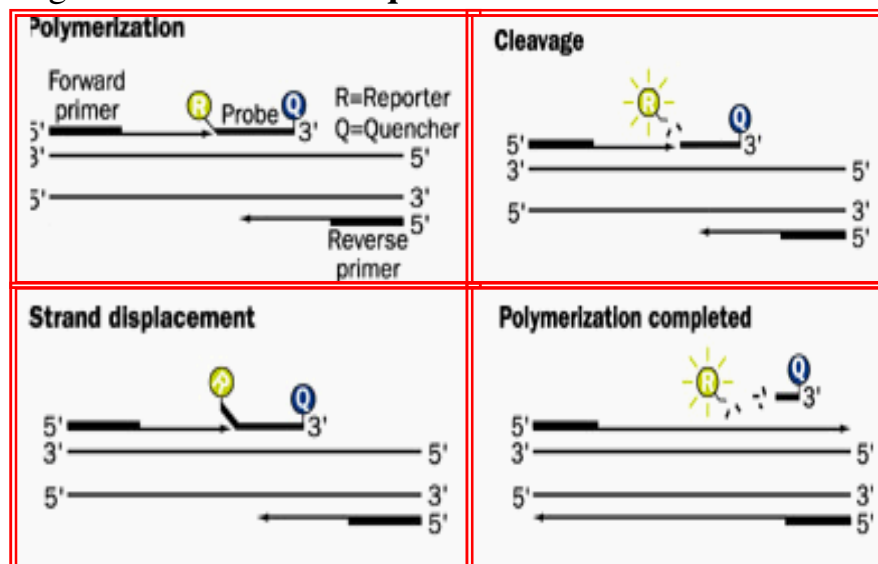
La degradazione della sonda non può avvenire quando questa è libera in soluzione, ma esclusivamente dopo annealing ai frammenti di neo-sintesi, per la citata attività 5' nucleasica, e corrisponde ad emissione di fluorescenza, per la separazione tra la molecola del reporter e del quencher.

L'amplificazione della sequenza target a sua volta, prosegue indisturbata dall'attacco della sonda, essendo questa scalzata dall'attività 5' nucleasica.

Il vantaggio di un sistema di questo tipo sta essenzialmente nella specificità della sonda, capace di legarsi solo ad ampliconi specifici. La possibilità di utilizzare diversi tipi di fluorocromi per mancare sonde

diverse, consente inoltre di rilevare più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex. Uno svantaggio sta invece nell'obbligo di sintetizzare, per ogni target, una sonda *ad hoc*. In aggiunta alle sonde TaqMan sono state proposte e brevettate altri tipi di sonde, quali FRET (Forster resonance energy transfer), SunRise, molecular beacons, Scorpions. In alternativa alle sonde fluorogeniche l'accumulo di amplificati si può seguire in Real Time utilizzando coloranti specifici del DNA con i seguenti vincoli: capacità di emettere fluorescenza crescente all'aumentare degli amplificati legati e capacità di non interferire in alcun modo nell'evolversi della reazione PCR.

Figura 5 **Chimica Taqman**



Un colorante dotato di queste caratteristiche è il SYBR Green I si lega anche a prodotti di amplificazione aspecifici eventualmente generati durante la reazione.

Gli strumenti per PCR Real Time, oltre a fungere da termociclatori, eccitano, durante la PCR con un laser a ioni argon o con lampade al tungsteno, i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta lungo fibre ottiche fino ad uno spettrografo che provvede a separare le componenti del reporter e del quencher.

Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. In maggiore dettaglio, l'algoritmo di analisi calcola l'emissione del reporter (R) e del quencher (Q) ogni pochi secondi.

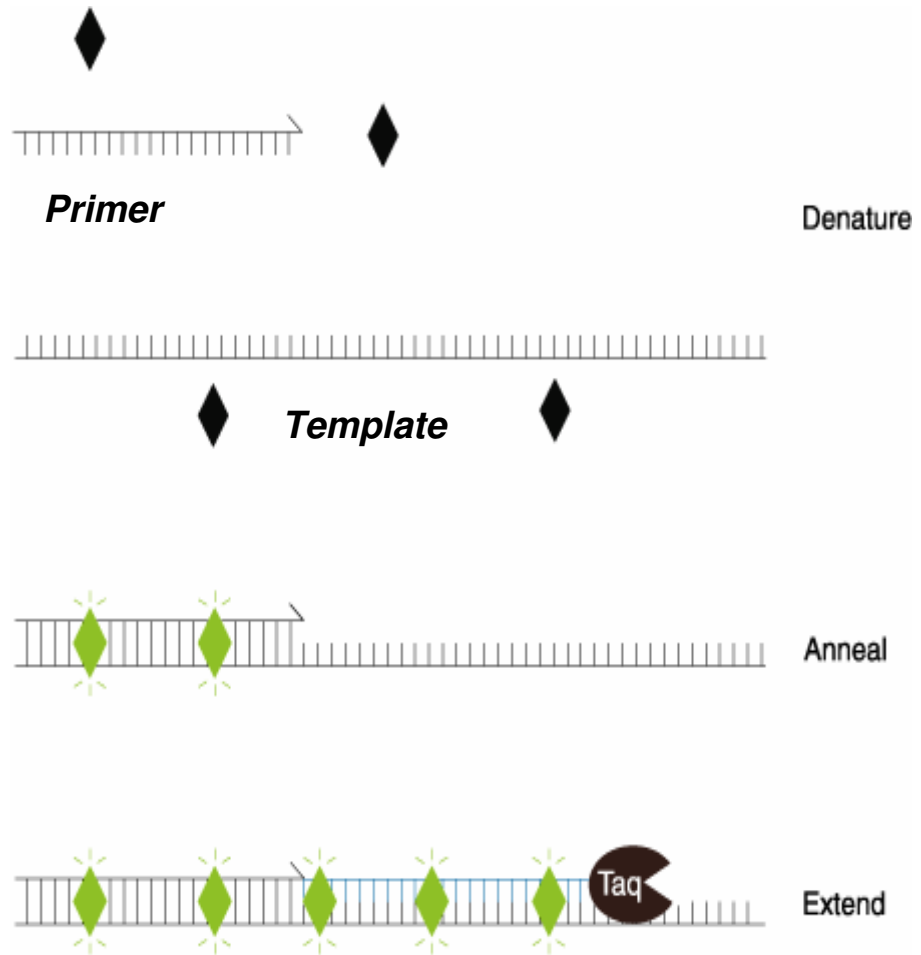
I valori di ΔR_n riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e possono essere rappresentati in un grafico in funzione del numero dei cicli.

Contemporaneamente, l'algoritmo determina il ciclo soglia che corrisponde ad effettiva emissione di fluorescenza, scorporata dal rumore di fondo. Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di

fluorescenza del reporter che separa i segnali di amplificazione specifici da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente. Una curva di referenza costruita con i Ct di campioni standard a contenuto di DNA noto in funzione del logaritmo della relativa quantità di DNA, consente poi l'estrapolazione del contenuto di DNA nei campioni incogniti. Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alla PCR tradizionale, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

Figura 6

Chimica SYBER GREEN I



CAPITOLO VI

SCOPO DELLA RICERCA

I prodotti lattiero caseari occupano nel comparto produttivo agroalimentare italiano in generale, e campano in particolare, un posto di rilievo. Poichè questi prodotti possono essere oggetto di frode scopo di questa tesi è stato la messa a punto di una metodica di biologia molecolare, per l'identificazione di specie in prodotti lattiero-caseari a denominazione di origine protetta, commercializzati sul territorio campano.

Tra i metodi che permettono l'identificazione di specie, la reazione a catena della polimerasi (PCR), rappresenta un efficiente e sensibile sistema anche da campioni sottoposti a precedenti trattamenti termici di sterilizzazione, stagionatura o cottura.

Infatti per il DNA la denaturazione indotta dalle alte temperature è una modificazione reversibile.

I metodi tradizionali di indagine sono gli immunologici, elettroforetici o cromatografici, tali metodi si basano sull'analisi delle proteine. Queste molecole sono poco resistenti al calore, pertanto la loro denaturazione rende difficile l'interpretazione di risultati ottenuti con prodotti sottoposti a trattamenti

termici anche blandi.

La PCR, soprattutto se effettuata scegliendo come bersaglio di amplificazione sequenze di DNA sufficientemente corte (<1000 bp), garantisce un risultato di amplificazione specie-specifico, anche in quei casi in cui il DNA nel campione risulti frammentato in seguito a trattamenti termici prolungati o ad intensi processi di omogeneizzazione. Oltre ai suddetti vantaggi, le tecniche che si basano sullo studio del DNA, sono più rapide ed economiche dei metodi basati sullo studio delle proteine (46).

In questa ricerca è stata applicato un nuovo metodo di analisi, che ha permesso nella fase di lettura dei dati di stabilire la presenza percentuale di latte vaccino in campioni dichiarati di sola bufala.

La tecnica PCR real time rappresenta anche nel settore alimentare un ottimo strumento di analisi per evidenziare eventuali frodi legate alla vendita di “aliud pro alio”. (9)

CAPITOLO VII

MATERIALI E METODI

Il DNA impiegato per le fasi preliminari della presente indagine, è stato estratto da sangue e tessuto muscolare di bovino (*Bos taurus*) e di bufalo (*Bubalus bubalis*).

In accordo con le finalità di questa tesi, sono stati utilizzati latte bovino e bufalino e la “mozzarella di Bufala”.

I campioni di latte sono stati prelevati presso aziende di produzione di solo latte bufalino o solo vaccino per evitare mescolanze involontarie.

Il latte campionato è stato utilizzato tal quale o miscelato in diverse proporzioni.

Il sangue e il tessuto muscolare di bovino e di bufalo sono stati utilizzati poiché da tali matrici è possibile ottenere elevate quantità di acidi nucleici utili alle fasi preliminari di applicazione delle tecniche di indagine molecolare.

Diversamente dal latte e dalla mozzarella, il DNA è estratto da cellule somatiche quali leucociti, macrofagi, linfociti e cellule dell’epitelio mammario, presenti in numero variabile in relazione a numerosi fattori primi tra i tanti la specie e la tecnologia di produzione cui il latte è sottoposto.

Per tali motivi la quantità di acidi nucleici estratta da

queste matrici è inferiore rispetto a quella estratta dai tessuti veri propri (7).

La media delle osservazioni delle cellule somatiche è pari a 133.485/ml; L'assenza di fenomeni infiammatori della mammella è indice di buone condizioni di allevamento e di alimentazione degli animali e di assenza di difetti della mungitura. I fenomeni mastitici influenzano negativamente la caseificazione perché causano una variazione nella composizione del latte, penalizzando la componente proteica caseinica.(49)

In una seconda fase della nostra indagine, in un caseificio della provincia di Caserta, in condizioni sperimentali controllate, sono stati prodotti campioni di mozzarella a partire da miscele di latte bufalino e bovino in diverse percentuali:

100% latte bufalino

80% latte bufalino e 20% latte bovino

70% latte bufalino e 30% latte bovino

50% latte bufalino e 50% latte bovino

La nostra indagine si è conclusa con l'applicazione del saggio di PCR real-time su tredici campioni di mozzarella (di cui sei campioni dichiarati di latte vaccino, un campione dichiarato misto e sei campioni definiti di sola bufala) acquistati presso punti vendita della provincia di Napoli al fine di effettuare una valutazione quantitativa della concentrazione di latte bufalino mediante confronto

con la curva standard precedentemente ottenuta. Le quantità stimate di latte bufalino nei tredici prodotti esaminati sono state confrontate con quanto riportato in etichetta.

7.1 Estrazione di DNA da sangue

7.1.1 Metodo Qiagen

I campioni di sangue sono stati prelevati con cateteri in condizioni asettiche da bufali e bovini e raccolti in eppendorf con l'aggiunta di eparina.

Il metodo presuppone che il DNA presente nella soluzione acquosa dopo trattamento chimico ed enzimatico si lega ad una resina (Spin Column, Qiagen), successivamente il DNA viene lavato con una soluzione contenente etanolo e staccato per eluizione con un piccolo volume di una soluzione acquosa tamponata (eluente).

In dettaglio, in una provetta sterile sono stati introdotti 200 μ L di campione di sangue ed in seguito sono stati aggiunti 200 μ L di buffer di lisi e 20 μ L di proteinasi K. Dopo 10 minuti di incubazione a 56°C sotto agitazione, sono stati aggiunti 20 μ L di etanolo (100%). Successivamente i campioni sono stati introdotti in una colonnina a scambio di resina e sono stati centrifugati per 1 minuto ad 8000rpm con l'aggiunta di buffer di lavaggio. Successivamente per l'eluizione del DNA, sono stati aggiunti 80 μ L di tampone di eluizione e centrifugati per 1

minuto a 8000rpm.

Dopo centrifugazione, il prodotto di eluizione è stato trasferito in una nuova provetta sterile. I campioni sono stati immagazzinati a -20°C per le successive analisi.

7.1.2 Reagenti e soluzioni impiegate

buffer di lisi

proteinasasi K

etanolo 100%

buffer di lavaggio

buffer di eluizione

7.2 Estrazione di DNA da tessuto muscolare

7.2.1 Metodo NucleoSpin Tissue

L'estrazione del DNA da tessuto muscolare è stata condotta prelevando campioni di tessuto muscolare fresco, con bisturi sterile. I campioni sono stati rapidamente trasportati in laboratorio in un contenitore isotermico a temperatura di refrigerazione e successivamente congelati a -20 °C fino al momento dell'analisi.

Da ciascun campione muscolare sono state prelevate aliquote di 25mg, utilizzate successivamente per l'estrazione con il kit "NucleoSpin Tissue"(Macherey-Nagel, Duren, Germany).

Aliquote di 25mg sono state aggiunte in eppendorf da

1.5ml alle quali è stato aggiunto 550µL di un tampone di lisi e 10µL di proteinasi K . I campioni sono stati incubati a 65°C per 30 minuti e successivamente centrifugati per 10 minuti a 10.000rpm. Successivamente 300µL di supernatante sono state aggiunte in una nuova eppendorf da 1.5ml con l'aggiunta di 300µL di buffer di lisi e 200µL di etanolo (100%). Dopo una serie di centrifughe per 1 minuto a 10.000rpm con buffer di lavaggio, i campioni sono stati eluiti in 100µL di tampone di eluizione precedentemente riscaldato a 70°C e centrifugati per 1 minuto ad 11.000rpm. I prodotti così ottenuti sono stati congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.

7.2.2 Reagenti e soluzioni impiegate

Tampone di lisi

Proteinasi K

Buffer di lavaggio

Etanolo 100%

Tampone di eluizione

7.3 Estrazione del DNA da campioni di latte

7.3.1 Metodo Wizard

Il metodo presuppone che il DNA presente nella soluzione acquosa dopo trattamento termico, chimico e enzimatico sia legato ad una resina di silicio (Wizard),

lavato con soluzione contenente alcool e eluito con un piccolo volume di soluzione acquosa tamponata (eluente).

I campioni di latte fresco intero sono stati trasportati rapidamente in laboratori e posti in beker alla temperatura di refrigerazione per una notte. Il giorno successivo sono state prelevate aliquote di 50ml di latte fresco precedentemente scremato allontanando il grasso di affioramento.

Quattro aliquote sono state centrifugate a 1500 rpm e il pellet così formato è stato risospeso in 860 μ L di buffer di estrazione e 100 μ L di 5M di guanidinium chloride e 40 μ L di proteinasi K.

Dopo incubazione per tre ore a 56-60°C, i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 14.000rpm.

Sono state prelevati 500 μ L del supernatante a cui sono stati aggiunti 5 μ L di Rnasi (500 μ g/ μ L), con successiva incubazione a 37°C per 10 minuti per eliminare eventuali residui di RNA di contaminazione.

Successivamente sono state preparate le colonne di cromatografia di Wizard-Resin e successivamente sono stati addizionati i campioni mediante l' utilizzo di siringhe da 2ml. Le miscele di DNA-resina sono state lavate con circa 2ml di isopropanolo all'80%; dopo centrifugazione per 30 secondi a 10000 rpm, sono state lasciate seccare per 5-15 minuti a temperatura ambiente.

In seguito, per l'eluizione del DNA, sono stati aggiunti 50µL di tampone di eluizione pre-incubato a 70°C. Dopo ulteriore centrifugazione per 1 minuto a 11000rpm, i prodotti di eluizione sono stati trasferiti in provette sterili e immagazzinati a -20°C per le successive analisi.

7.3.2 Reagenti e soluzioni impiegate

Tampone di estrazione:

- Tris 10mM
- NaCl 150mM
- EDTA 2mM
- SDS 1%

Cloridrato di guanidina 5M

Proteinasi K

Isopropanolo 80%

Tampone di eluizione

7.4 Estrazione del DNA da derivati del latte

7.4.1 Metodo Dnase Tissue Qiagen

L'estrazione del DNA genomico dai derivati del latte come la mozzarella, è stato effettuato secondo quanto indicato precedentemente dal Kit della Qiagen per l'estrazione del DNA da sangue, con leggere modifiche, riguardanti l'aggiunta di due lavaggi in etanolo al 70% del pellet.

7.5 Verifica qualità e quantificazione del DNA

- **Sul gel di Agarosio**

Per valutare la qualità del DNA estratto è stata preparata una soluzione contenente:

- 1 μ L di ogni campione di DNA
- 9 μ L di acqua distillata sterile
- 2 μ L di loading buffer 6x (descritto in seguito)

Questa è stata caricata e analizzata su un gel d'agarosio allo 0.8% w/v assieme ad un marcatore di peso molecolare. La metodologia elettroforetica è riportata nei paragrafi successivi.

- **Con spettrofotometro**

Ogni campione è stato analizzato allo spettrofotometro per ottenere letture all'assorbanza UV a 260 e 280nm, allo scopo di determinare la concentrazione del DNA nel campione.

7.5.1 Analisi elettroforetica su gel di agarosio

Il DNA genomico totale è stato analizzato mediante separazione elettroforetica sul gel di agarosio.

La concentrazione del gel è stata scelta in base alla taglia dei frammenti di DNA da analizzare.

L'agarosio è stato sciolto nel tampone di corsa (TBE 1x) e lasciato raffreddare in apposito stampo con un pettine per la formazione dei pozzetti.

Per evidenziare gli acidi nucleici è stato utilizzato

bromuro etidio (EtBr), intercalante della doppia elica che consente di visualizzare le bande di DNA agli UV.

Per la separazione è stata applicata una differenza di potenziale pari a 5-7V per ogni centimetro di lunghezza del gel.

Per l'attribuzione del peso molecolare dei frammenti, si è utilizzato il set di marcatori 1Kb Ladder (Gibco BRL). L'elettroforesi è stata fatta in celle elettroforetiche orizzontali BIORAD (sub-cell).

7.5.2 Soluzioni impiegate

Loading Buffer 6x:

- Blu di bromofenolo
- Cilene
- Glicerolo
- H₂O distillata sterile

TBE 10x

- Tris
- Acido borico
- EDTA 0.5M pH 8.0
- H₂O distillata

Il gel è stato osservato direttamente su transilluminatore UV, oppure con lo strumento a telecamera GelDoc 1000 e digitalizzato grazie al software Molecular Analyst BioRad.

7.6. Analisi PCR: Primers utilizzati

Il DNA estratto dalle varie matrici, non presentava inibitori della reazione della polimerasi, è stato pertanto possibile ottenere una buona efficienza di amplificazione degli acidi nucleici (41).

L'amplificazione è stata ottenuta con primers specifici in grado di discriminare la specie *Bos taurus* dalla specie *Bubalus bubalis*.

In una prima fase della sperimentazione sono stati usati primers 14814-15092 specifici per la specie *Bos taurus*, numero di accesso a GenBank J01394, ed i primers 301-492 specifici per la specie *Bubalus bubalis*, numero di accesso in GenBank D82894.

Tuttavia questi ultimi primers utilizzati da altri autori in tecniche di PCR and Point, hanno mostrato scarsa specificità quando adoperati con tecniche PCR Real-Time, per tanto è stato necessario, mediante lo studio indirizzato preferenzialmente sul DNA mitocondriale, evidenziare frammenti genomici specifici, sui quali disegnare primers in grado di discriminare la specie *Bubalus bubalis*.

L'efficienza dell'amplificazione di tali primers, è stata valutata mediante tecniche PCR-Real-Time, utilizzando quale sistema di normalizzazione della reazione, i primers GADP.

Questi primers sono stati disegnati per amplificare la glyceraldehyde-3phosphate deydrogenase di *Bos taurus* ed applicati con successo anche per l'amplificazione in *Bubalus bubalis*.

Nella nostra ricerca quindi sono stati utilizzati tre coppie di primers (vedi tabella 3):

- **I primers GAPD** disegnati sulla 3-fosfatodeidrogenasi bovina, utilizzato come gene di referenza per normalizzare la reazione di amplificazione del DNA bovino e bufalino.(42)
- **I primers 14814-15092** disegnati e utilizzati da Bottero et coll.
- **I primers 18/125** disegnati sul gene 12S ribosomiale di *Bubalus bubalis* (gi I33112041I gb IAY327817.1I) con il programma Primer Express software 2.0 (Applied Biosystems, Forster City, CA-USA).

La sensibilità e l'efficienza dei primers impiegati nella presente indagine, sono stati testati utilizzando diluizioni seriali del DNA estratto da campioni di sangue, di tessuto muscolare e da miscele di latte e derivati.

L'efficienza è stata calcolata in accordo con Rasmussen (42) sulla base dell'espressione:

$$\text{efficienza} = (1 - 10^{-1/\text{slope}}) \%$$

Primer	Sequenze 5'-3'	Temperatura di annealing	Dimensioni dell' amplicone (bp)	Numero di accesso (GenBank)	referimento
GAPDF	GGCGTGAA CCACGAGA AGTATAA	60	120	1841757	RTPrimerDB
GAPDR	CCCTCCACG ATGCCAAAG T	60	120	1841757	RTPrimerDB
14814	GGCTTATAT TACGGGTCT TACT	60	279	J01394	Bottero et coll
15092	GGCAATTGC TATGATGAT AAATGGA	60	279	J01394	Bottero et coll
18	CCATAAATT CCAAAAATA GACAACCA	60	107	33112042	Proposti
125	AGGAGAAA GTGTTTCTT GTTACTCAT ATTAAC	60	107	33112042	Proposti

Tab.3

7.7 Real Time PCR con SYBR Green dye

Le analisi condotte mediante PCR real Time, usando il sistema SYBR Green, basato sulla presenza di una molecola fluorescente in grado di intercalarsi e legarsi durante la reazione di PCR all'interno del doppio filamento di DNA che si forma ad ogni ciclo di amplificazione (42).

Per ogni reazione sono stati utilizzati : 12.5 μ L di SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystem), 900nM di ciascun primers, 50ng di DNA genomico e acqua bidistillata sterile, per un volume finale di 25 μ L. Tutti i campioni e i controllo sono stati eseguiti in doppio.

La mix PCR è stata sottoposta ad un primo ciclo di amplificazione con temperature di 50°C per 5 minuti e di 95°C per 10 minuti. Dopo questo step iniziale, sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione, con le seguenti condizioni per ciascun ciclo:

- 95°C per 20 secondi
- 60°C per 1 minuto

Le reazioni di PCR sono state sottoposte ad un protocollo di dissociazione termica in PE Biosystems 5700 software per l'analisi della curva di melting di ciascun prodotto di amplificazione.

Durante il ciclo finale di PCR le reazioni di

amplificazione sono state riscaldate/denaturate per 0.3°C/s con un gradiente di temperatura che oscilla tra i 60°C e i 90°C, per calcolare la temperatura di melting degli amplificati.



7.8 Real Time PCR: lettura dei dati

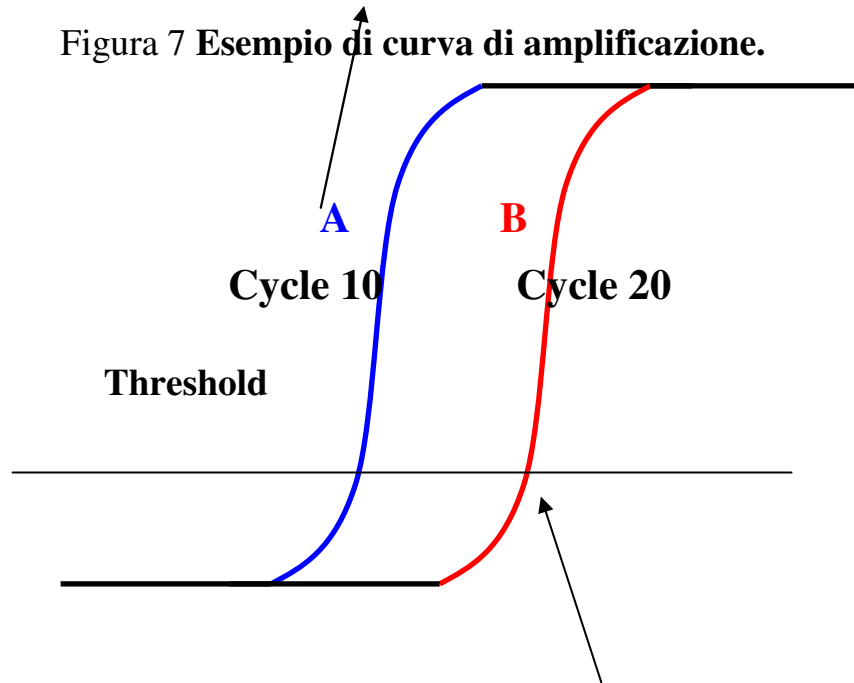
I dati ottenuti dalla real time PCR sono stati calcolati come il valore ΔR_n : l'emissione della fluorescenza sul numero di cicli di reazione (42).

Il software dell'Applied Biosystems 5700 sequence detection system, calcola il ΔR_n mediante l'equazione $\Delta R_n = (R_{+n}) - (R_{-n})$ dove R_{+n} è il segnale fluorescente della baseline durante i cicli 6-15.

Il threshold arbitrario è stato misurato ad un valore intermedio del $\log \Delta R_n$ /numero di cicli. Il valore di C_t è stato definito come il ciclo durante il quale la ΔR_n

incrocia il threshold stabilito.

Figura 7 Esempio di curva di amplificazione.



CAPITOLO VIII

“RISULTATI”

Il Dna estratto da campioni di sangue, tessuto muscolare, latte e derivati di origine bovina e bufalina è stato amplificato mediante PCR real time con primer specifici per la specie **Bos taurus** e **Bubalus bubalis**.

Quale sistema di normalizzazione della reazione di amplificazione sono stati adoperati i primers GAPD. Questi primers sono stati disegnati per amplificare tratti del gene che codifica per la gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi in **Bos taurus**.(42)

In questo lavoro di tesi è stata dimostrata la validità del loro impiego per amplificare il corrispondente gene del bufalo.

In figura 8 è riportata la curva standard ottenuta mediante amplificazioni di diluizioni seriali di DNA estratto da tessuto muscolare di bufalo con i primers GAPD.

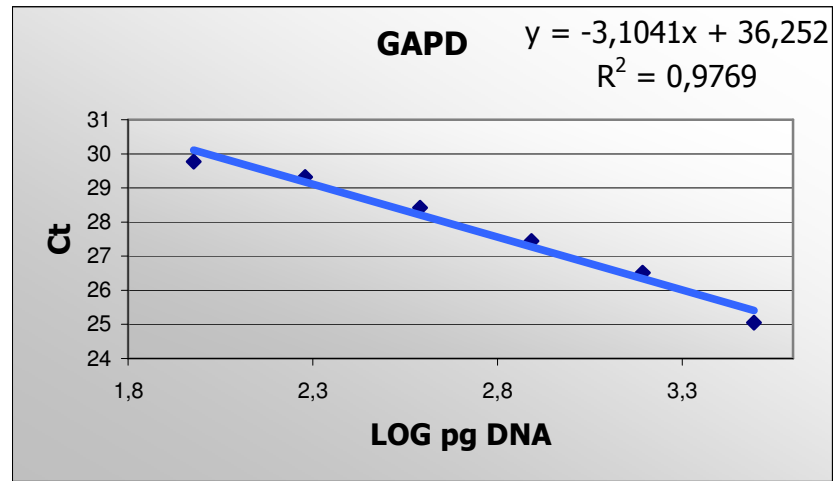


fig.8

In ascissa è riportato il valore del logaritmo decimale di differenti concentrazioni del DNA (nel range da 95 a 3120pg ottenuto mediante diluizioni scalari, corrispondenti ad una scala logaritmica compresa tra 1.8-3.6). Laddove il valore 95pg corrisponde a circa 20 genomici aploidi.

In ordinata è riportato il valore Ct (ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il treshold, che rappresenta il valore delle emissioni di fondo).

La retta di regressione presenta un valore R^2 (0.9769) indice di una stretta relazione tra concentrazione di DNA e Ct. Inoltre lo slope della retta (pari a -3.1041) esprime una elevata efficienza della reazione (valore prossimo al 100%) secondo l'espressione proposta da Rasmussen.

Pertanto possiamo assumere GAPD quale sistema di normalizzazione della reazione di amplificazione del

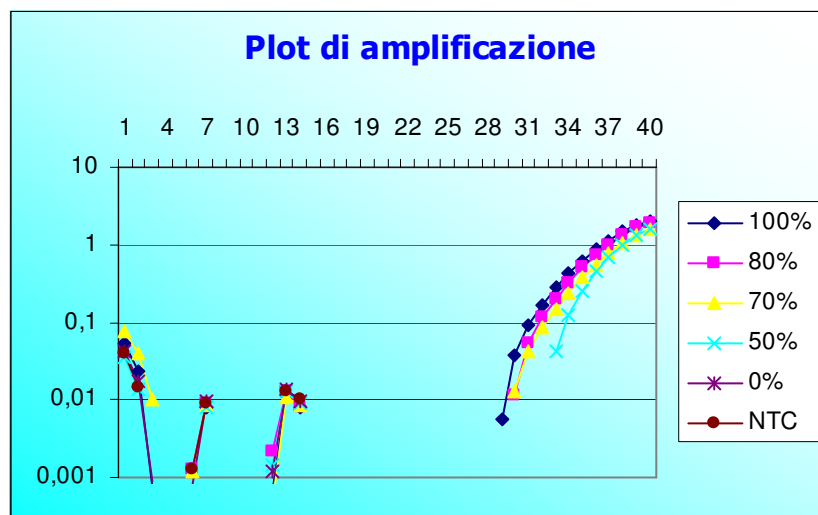
DNA di bufalo.

I test condotti per verificare la specificità di specie dei primers 301/492 proposti da Bottero e coll. (6) non hanno dato esito soddisfacente.

Pertanto è stato identificato un insieme di regioni genomiche divergenti tra la specie Bos e Bubalus, e a seguito di un esteso screening è stata individuata per la loro specificità una regione del gene RNA ribosomiale 12S di Bubalus e quindi disegnati i primers 18-125.

Nelle figure 9-10 sono riportati i plot di amplificazione e le curve di melting ottenute mediante il saggio SYBR Green PCR real time condotti su campioni contenenti differenti percentuali di DNA bufalino e bovino.

Fig.9

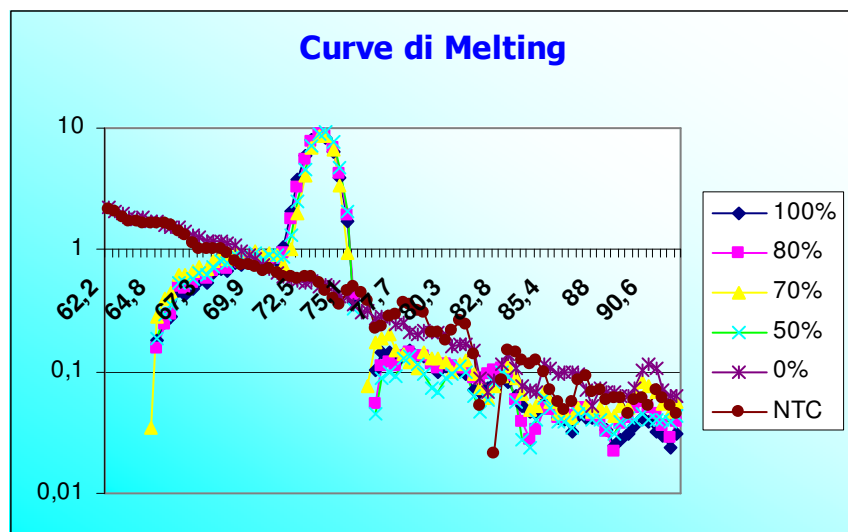


I primers 18-125 sono stati testati su 5 miscele di DNA

bufalino e bovino (100-80-70-50-0 % DNA di bufalo e complemento a 100 con DNA bovino).

Per miscele di DNA bufalino/bovini pari 100, 80, 70 e 50% si

fig.10



ottengono curve di amplificazione con Ct crescenti in accordo con la diminuzione delle concentrazione di DNA bufalino.

Per miscele di DNA bufalino/bovino pari a 0% e nel NTC (controllo negativo), non si osserva alcun segnale di amplificazione (solo emissioni di fluorescenze di fondo).

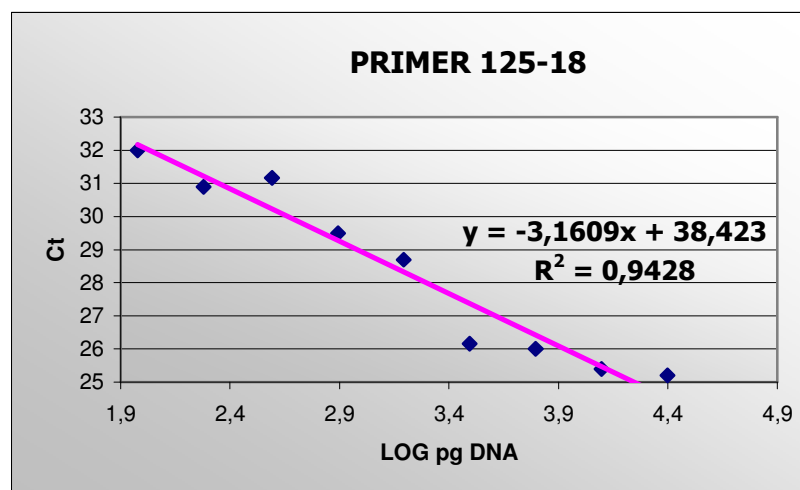
Inoltre non vi è alcun segnale di amplificazione con DNA di solo bovino e in NTC. In relazione a quanto osservato si può affermare che i primers 18-125 sono altamente specifici per il DNA di origine bufalino.

A conferma di quanto affermato, possiamo osservare

che tutti gli ampliconi provenienti da miscele con DNA bufalino hanno la medesima temperatura di melting 73.3°C.

La sensibilità e l'efficienza dei primers 18-125, sono state testate su di una diluizione seriale di DNA bufalino estratto da sangue e tessuto muscolare nel range di 95 a 25.000 pg (figura 11).

FIG.11



In ascissa è riportato il valore del logaritmo decimale di differenti concentrazioni di DNA estratto da sangue e tessuto muscolare di bufalo (nel range di 95 a 25.000 pg, ottenuto mediante diluizioni scalari, corrispondenti ad una scala logaritmica compresa tra 1.8- 4.4).

Laddove il valore di 95 pg corrisponde a 20 genomici aploidi.

In ordinata è riportato il valore Ct (ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il treshold, che

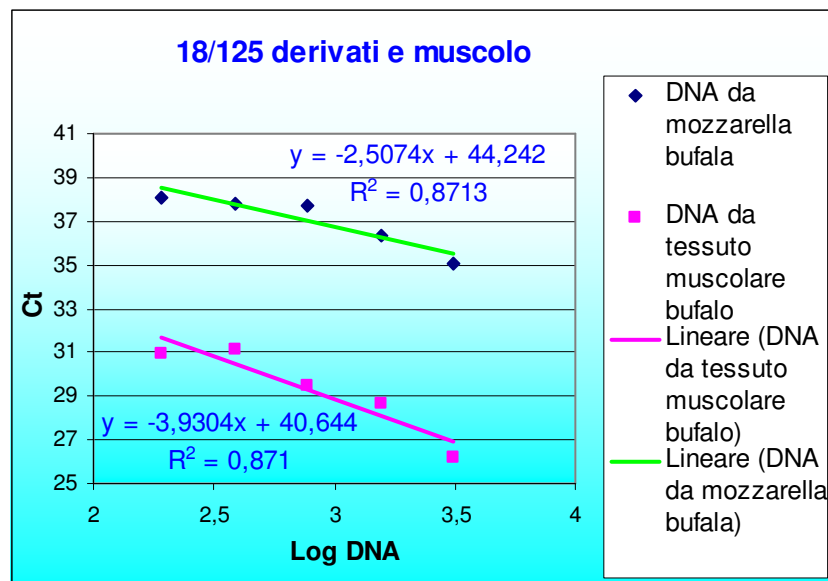
rappresenta il valore delle emissioni di fondo).

La retta di regressione presenta un elevato R^2 (0.9428, più basso rispetto al GAPD), indice comunque di una stretta relazione tra concentrazione di DNA e Ct. Inoltre lo slope della retta (pari a -3.1609) esprime un'alta efficienza della reazione di amplificazione (valore quasi pari al 100%).

E' possibile affermare che i primers 18-125 sono altamente efficienti, l'alta efficienza è espressione della specificità del disegno dei primers e della purezza del DNA testato.

Un'indagine sulla presenza di eventuali inibitori della Taq polimerasi è stata effettuata su diluizioni seriali di DNA estratto da derivati del latte bufalino (100% latte bufalino).(figura 12)

fig.12



In ascissa è riportato il valore del logaritmo decimale di

differenti concentrazioni di DNA estratto da latte (nel range di 190 a 3120 pg, ottenuto mediante diluizioni scalari, corrispondenti ad una scala logaritmica compresa tra 2.2 – 3.6).

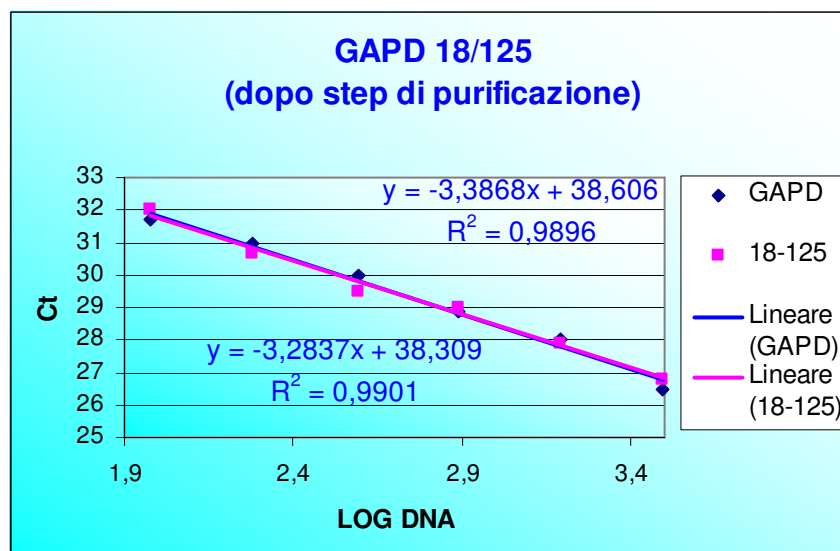
In ordinata è riportato il valore Ct (ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il treshold, che rappresenta il valore delle emissioni di fondo).

La retta di regressione presenta un elevato R^2 (0.8713 più basso rispetto a GAPD e 18-125 testati su sangue e tessuto muscolare), indice comunque di una stretta relazione tra concentrazione di DNA e Ct. Inoltre lo slope della retta (pari a -2.5074) esprime una discreta efficienza della reazione.

Possiamo considerare i primers 18-125 discretamente efficienti nella reazione di amplificazione del DNA bufalino estratto da latte. La discreta efficienza è espressione della complessità della matrice di estrazione con particolari riguardi alla purezza del DNA testato (possibili inibitori).

Successivamente il saggio di RT-PCR con i primers GAPD e 18-125 è stato condotto a partire da DNA estratto da campioni di latte e derivati (figura 13), ai quali è applicato uno step di purificazione aggiuntivo.

fig.13



In ascissa è riportato il valore del logaritmo decimale di differenti concentrazioni di DNA estratto da latte (nel range di 95 a 3120 pg ottenuto mediante diluizioni scalari, corrispondenti ad una scala logaritmica compresa tra 1.9-3.4). Laddove il valore 95 pg corrisponde a 20 genomici aploidi.

In ordinata è riportato il valore Ct (ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il treshold, che rappresenta il valore delle emissioni di fondo).

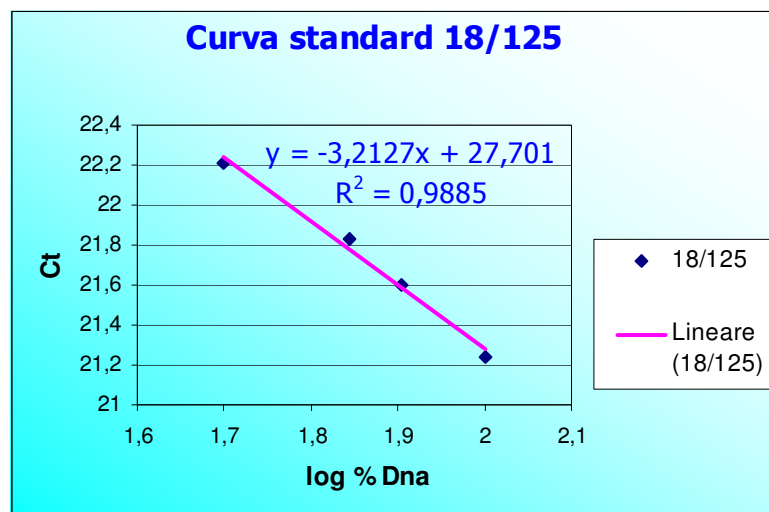
Le rette di regressione presentano elevati R^2 (0.9896-0.9901, le più elevate in assoluto), indice comunque di una stretta relazione tra concentrazione di DNA e Ct. Inoltre gli slope della retta (pari a -3.3868, -3.2837) esprimono una elevata efficienza della reazione (valore vicino al 100%).

Possiamo considerare i primers GAPD e 18-125 ad

elevata efficienza nella reazione di amplificazione del DNA di bufalo estratto da latte e previa purificazione. Sulla base di tali risultati è stato possibile disegnare una curva standard per la quantificazione del latte bufalino in prodotti lattiero caseari per i primers 18/125(figura 14).

Il grafico è disegnato a partire da risultati ottenuti per miscele sperimentali di latte bovino e bufalino nei rapporti di 100,80,70 e 50% con complemento a 100 con latte bovino.

fig.14



In ascissa sono riportati i valori del logaritmo della concentrazione sperimentale di latte bufalino della miscela con valori compresi tra 2 (100%), 1.9 (80%), 1.85 (70%), 1.7 (50%).

In ordinata è riportato il valore di Ct (ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il treshold, che

rappresenta il valore delle emissioni di fondo).

La retta di regressione presenta un elevato R^2 (0.9885), indice di una stretta relazione tra concentrazione di DNA e Ct. Inoltre lo slope della retta (pari a -3,2127) esprime una elevata efficienza della reazione (valore vicino al 100%).

Sulla base di questa osservazione è stato applicato il Saggio di RT-PCR su n.13 campioni di mozzarella acquistati presso punti vendita in provincia di Napoli al fine di effettuare una valutazione quantitativa della concentrazione di latte bufalino mediante confronto con la curva standard precedentemente ottenuta. In tabella sono riportate le quantità stimate di latte bufalino nei 13 prodotti esaminati e confrontate con le dichiarazioni riportate in etichetta. Per i 6 come mozzarella di solo latte vaccino (campioni nn. 1, 2, 7, 8, 10, 11) la quantità di latte bufalino è assente o minima (con *range* compreso tra < 0,1 e 3,2%).

Per l'unico campione dichiarato come mozzarella mista (n. 4), è stata accertata una quantità di latte bufalino stimata al 50%.

Per i sei campioni dichiarati come mozzarella di bufala (n. 3, 5, 6, 9, 12 e 13) solo in due casi è stata stimata una presenza del 100% di latte bufalino (campioni n. 3 e 9). Per i restanti quattro campioni sono stati stimati tenori di latte di bufala inferiori al 25%. In particolare nel

campione n. 12 è stato stimato un valore irrisorio della materia prima dichiarata (4,7%), valori più alti sono stati stimati nei campioni n. 5, 6 e 13 con valori percentuali di latte bufalino pari a 23, 21 e 22, rispettivamente.

Numero Campione	% latte bufalino	Etichettatura
1	< 0,1	mozzarella vaccina
2	3,2	mozzarella vaccina
3	100	mozzarella bufala
4	50	mozzarella mista
5	23	mozzarella bufala
6	21	mozzarella bufala
7	3	mozzarella vaccina
8	< 0,1	mozzarella vaccina
9	100	mozzarella bufala
10	< 0,1	mozzarella vaccina
11	1,3	mozzarella vaccina
12	4,7	mozzarella bufala
13	22	mozzarella bufala

Tab.3

CAPITOLO IX

CONCLUSIONI

Le frodi nel settore alimentare rappresentano un danno per il consumatore e possono compromettere la genuinità e qualità dei prodotti fino ad indebolire i marchi di fabbricazione (D.O.P.) attribuiti alle produzioni tipiche.

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente studio, è stato possibile proporre un metodo di analisi biomolecolare adatto a rivelare la presenza di frodi per sostituzione di specie nel settore lattiero-caseario. Infatti la tecnica utilizzata è in grado di identificare e quantificare la specie di provenienza del latte impiegato per la produzione di mozzarella.

Il metodo di indagine proposto è basato sulla tecnica PCR real time mediante SYBR Green. Per la stesura del protocollo di analisi è stato necessario individuare due coppie di primers che avessero la stessa efficienza e temperatura di annealing. I primers 18/125, appositamente disegnati per questa indagine, sono stati riconosciuti come altamente specifici per la specie *Bubalus bubalis*, e la coppia dei primers GADP impiegati da altri autori (42) come sistema di normalizzazione della reazione di

amplificazione per la specie bovina, possono essere assunti allo stesso scopo per la specie bufalina.

La determinazione quantitativa della eventuale presenza di latte bovino impiegato per la produzione della mozzarella di bufala campana DOP è necessaria al fine del rispetto delle norme del disciplinare che prescrivono l'impiego unicamente di latte di bufala.

Tuttavia, la presenza di tracce di latte bovino può essere dovuta a contaminazioni accidentali che si verificano durante le fasi di stoccaggio e lavorazione della mozzarella. Infatti la maggior parte delle aziende campane lavora sia latte di bufala che latte vaccino, utilizzando le stesse attrezzature (10).

Per altro verso, la sostituzione di latte di bufala con latte vaccino, meno costoso, può essere intenzionale e quindi costituire una frode quando esso è presente in prodotti etichettati come Mozzarella di Bufala Campana in quantità tali da non modificare le caratteristiche organolettiche del prodotto e tuttavia apportare un vantaggio al produttore derivante da un fraudolento impiego di latte vaccino.

La elevata sensibilità della procedura di analisi adottata nel presente studio è tale da consentire la determinazione quantitativa della specie di provenienza del latte utilizzato per la produzione di

mozzarella di bufala campana fino al limite di 0,01%.

Pertanto la metodica d'indagine proposta è un ottimo strumento d'analisi per evidenziare eventuali violazioni del D.M. 219 del 1993.

La tecnica utilizzata ha consentito il riconoscimento di specie in prodotti lattiero-caseari sottoposti a trattamenti termici anche energici durante le fasi di lavorazione. Dei 13 campioni esaminati è stato possibile confermare quanto riportato in etichetta; solo 3 campioni etichettati come mozzarella di sola bufala presentavano una percentuale elevata di latte vaccino (superiore al 75%) quale componente della miscela .

Pertanto la tecnica proposta rappresenta un'ulteriore possibilità di controllo analitico di alimenti trasformati, in alternativa o come supporto alle tecniche di riconoscimento mediante cromatografia liquida ad alta prestazione e di analisi dei pattern proteici.

Inoltre, si presenta come uno strumento valido per valorizzare le recenti disposizioni normative sulla tracciabilità del prodotto in vendita, in conformità con l'art. 18 del regolamento CE 178/2002.

In accordo con le indicazioni CE - che sottolineano la necessità di una maggiore trasparenza a tutti i

livelli della politica alimentare, tale da contribuire ad accreditare garanzia ai prodotti posti in commercio e ad infondere maggiore sicurezza nel consumatore, indirizzandolo verso una scelta consapevole- la metodica adottata appare utile al riconoscimento di frodi di carattere commerciale per la vendita di *aliud pro alio*.

BIBLIOGRAFIA

1) Addeo F., Chianese L., Anelli G. (1982)

“Riconoscimento e dosaggio del latte vaccino nel formaggio Mozzarella di Bufala Rivista italiana Sc. Alim; p.10-38

2) Alicandri L. (1915)

“Il Mazzone nell’antichità e nei tempi presenti”, Napoli p.88 nota.

3) Alicandri L. (1915) Branciarri R., Nijman I.J., Pias M.E., Di Antonio E., Lenstra J.A. (2000)

Species origin of milk in italian Mozzarella and Greek Feta cheese .
Journal of food protection, vol.63 n.3, p.408-411

4) Berry A.J. and Peter J.B. (1984)

DNA probes for infectious disease. Deagn.Med. 7: p.62-72

5) Bianchi A., Dal Sasso D., Manera C. (1985)

“Piccoli caseifici per la produzione di formaggi a pasta filata”. Genio rurale N° 7-8, p. 35-46

6) Bottero M.T, Civera T., Anastasio A., Turi A.M., Rosati S. (2001)

Identification of Cow's Milk in "Buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction Journal of food Protection p.262-266

7) Branciaro R., Nijman I.J., Pias M.E., Di Antonio E., Lenstra J.A. (2000)

Species origin of milk in Italian Mozzarella and Greek Feta cheese .
Journal of food protection, vol.63 n.3, p.408-411

8) Campanile Castaldo M., (1991)

1960, "La bufala e il suo tipico prodotto la Mozzarella". Rivista di Zootecnica XXXIII, n 7-8, p.4 (dell'estratto) IDEM, "Un prodotto tipico della terra aurunca: Civiltà Aurunca" VII att.dis n 17, 50-51

9) Cattaneo T., Contarini G., Rampilli M., Toppino P. (2001)

"Prevenzione delle frodi nel burro e nei formaggi". Ed agricole Bologna

10) Cerrato M. (1999)

La filiera della Mozzarella di Bufala Campana nell'area della denominazione di Origine Protetta(D.O.P.)Cap. 1-7-9-12

11) Cf: (1998) “Il presepe napoletano nel museo di S. Martino” a cura di T. Fittipaldi, Napoli, p.136-151

12) Ciampi P., Paiani M. (1993)

“Il bufalo italiano la sua storia”. Ingegneria alimentare: Parte I, aprile, 64-69; Parte II maggio 1993, 53-59; Parte III giugno 1993, 47-52

13) Correale E. (2003),

Evoluzioni delle frodi nel settore della Mozzarella di Bufala Campana

Bubalus bubalis I, pag. 20) **Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri** n. 219 del 17/9/93, p.12-13

14) Cortesi M.L., Maranelli A. (1982)

“Fiordilatte e Mozzarella: Considerazioni di ordine igienico e normativo”. Industrie Alimentari, luglio-agosto, p. 528-531

15) Decreto Ministeriale 1998 n.110 del 14/5/98

16) Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri n. 219 del 17/9/93,
p.12-13

17) Decreto del 7 aprile del Ministero delle Politiche Agricole (Gazzetta Ufficiale 14 maggio 1998, n. 110) “Determinazione degli elementi di etichettatura per il prodotto a denominazione di origine protetta “Mozzarella di Bufala Campana”

18) Decreto del Presidente dei Ministri del 10/5/1993

Riconoscimento della denominazione di origine “Mozzarella di Bufala Campana”

19) Decreto del Presidente della Repubblica 18 maggio 1982 (Gazzetta Ufficiale n 156 del 9/6/1982) : attuazione della direttiva (CEE) n 79/112 relativa ai prodotti alimentari destinati al consumo finale ed alla relativa pubblicità nonché della direttiva (CEE) n 77/94 relativa ai prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare

20) De Franciscis G.

“Tutto sulla bufala” L'allevatore 1969

21) De Stefano F. (2003)

Problemi economici della filiera del latte bufalino, *Bubalus bubalis* III, p. 46

22) Diviaco S., Norio P., Zentilin L., Menzo S., Clementi M., Biamonti G. et al (1992).

A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*. 122: p. 3013-3020

23) Ferrara B., Intriari F. (1974)

“ Caratteristiche e impiego del latte di bufala”. *Rivista di Zootecnica Vet*, p.1-2

24) Ferrè F., Marchese A., Pezzoli P., Griffin S., Buxton E., and Boyer V. (1994)

Quantitative PCR: an overview. In: Mullis K.B., Ferrè F., and Gibbs R.A., editors. *The polymerase chain reaction*. Basel, Berlin: Birkhauser boston:p 67-88

25) Fonte FAO

26) Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., and Bunn H.F. (1990)

Analysis of cytokine mRNA and DNA : Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:p. 2725-2729

27) Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. (1996)

Real Time Quantitative PCR. PCR Methods & Application. 6 (10): p. -986-994

28) Hemmer W. (1997)Foods derived from genetically modified organism and detection methods. BATS- Report 2/97, BATS, Clarastrasse 13, 4058, Switzerland

29) Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R. (1992)

Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 10: p. 413-417

30) Holland P.M., Ambramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H.

Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaicus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 88:p 7276-7280 (1991)

31)Howgate P.F.

Quality assessment and quality control.In: Aitken A. et al (eds), Fish handling and processing 2nd ed, 177-186, Her Majesty's Stationary Edinburgh

32) Karch H., Schwarzkopf A., and Schmidt H. (1995).

Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples). J.Microbiol.Methods. 23: p.55-73

33) Lee L.G., Connel C.R., and Bloch W. (1993)

Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probs. Nucleic Acids Research. 21: p. 3761-3766

34) Mahony J.B., Luinstra K.E., Waner J., MacNab G., Hobranzka H., Gregson D., Sellors J.W., and Chernesky M.A. (1994)

Interlaboratory agreement study of double set of PCR plasmid primers for detection of *Chlamydia trachomatis* in a variety of genitourinary specimens. *J.Clin. Microbiol.* 32: p.87-91

35) Meyer P. (1995).

Understanding controlling transgene expression. *Trends in Biotechnology.* 13: p.332-337

36) Mondini E. (1987)

“Tradizione e novità nei nomi delle bufale” *Zootecnica* vol.V VI

37) Mullis K.B., Ferrè F., and Gibbs R.A. (1998)

“The Polymerase Chain reaction. Birkauser- Vergal, Basel

38) Orlando C., Pinzani P., and Pazzagli M. (1998)

Developments in quantitative PCR. *Clin.Chem Lab Med.* 36 (5): p. 255-269

39) Piatak M.J., Luck K.C., Williams B., and Lifson J.D. (1993)

Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques*. 14:p.70-81

40) Pietri, (2004),

Micotossine negli alimenti Zootecnici e passaggio nel latte **Alimenta settembre 2004**

41) Radura Li B., Fu D.J. ,Watson D (2004)

Genomics n 83, p.301-320

42) Rasmussen R., Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (2001)

Rapid cycle Real time PCR, *Methods and Applications*. p.21-34

43) Regolamento CEE N° 1107/96 della Commissione del 12 giugno 1996.

“Registrazione delle indicazioni geografiche e della denominazione di origine” nel quadro della procedura di cui il 17 del regolamento CE N° 2081/96 del Consiglio, **Gazzetta Ufficiale N°148 del 21/06/1996**

44) Regolamento CE 2081/92 modificato dal Reg CE 535/97, 692/2003, 806/2003. Protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed alimentari

45) Riconoscimento e dosaggio del siero di latte vaccino nel latte di bufala e nei formaggi prodotti con l'impiego totale o parziale di latte di bufala mediante RP-HPLC delle sieroproteine specifiche

46) Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., et al. (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230 p. 1350-1354

47) Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. Erlich H.A. (1998)

Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, p. 487-482

48) Siebert P.D., and Larrick J.W. (1993)

PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standars
in quantitative PCR. Bio Techniques 14: p. 244-249

**49) Supino M.T., M. Gallo, G. Capo, C.Morena, G. Durante, G. Galero
(2004)**

Il latte bufalino prodotto nella provincia di Salerno: valutazione dei
parametri sanitari e merceologici, Bubalus bubalis I, p. 24

50)Valletrisco M. (1984)

“La produzione lattiero-casearia e la struttura delle aziende nella
penisola sorrentina. Industrie Alimentari febbraio, p. 92-98

51) Wolcott M.J. (1992).

Advances in nucleic – acid basic detection methods. Clin.Microbiol.
Rev. 5: p.370-386

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa M.L.Cortesi per avermi dato la possibilità, grazie ai suoi consigli, di poter crescere e migliorare sempre di più.

Voglio esprimere grandissima riconoscenza all'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura e la Dott.ssa Valeria Terzi per l'ospitalità e la collaborazione.

In modo particolare voglio ringraziare il mio tutor Dott.ssa Tiziana Pepe, che grazie al suo atteggiamento positivo, è riuscita a non farmi scoraggiare e mi ha sempre aiutato in ogni mia difficoltà.

Ringrazio le mie colleghe che mi hanno aiutato nello svolgimento della Tesi.

Non posso non ringraziare la mia famiglia ed il mio fidanzato Matteo che, in questi anni mi sono stati sempre vicini e mi hanno dato la possibilità di crescere e maturare.

Lisa Di Marco