



Stefano Sforza
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università di Parma
stefano.sforza@unipr.it

LE MOLECOLE DELL'AUTENTICITÀ

L'autenticità degli alimenti può essere oggettivamente verificata impiegando composti organici presenti negli alimenti stessi da utilizzarsi come "marcatori molecolari". DNA, proteine, peptidi, metaboliti secondari possono oggi essere determinati con elevata sensibilità e accuratezza mediante tecniche che ci consentono di certificare l'autenticità dell'alimento.

La qualità di un dato alimento, e soprattutto la qualità percepita dal consumatore, è un parametro fondamentale che influenza profondamente la scelta dei prodotti alimentari. "Qualità" è però una parola di difficile definizione in tutti i contesti e quello alimentare non fa eccezione. Anche la norma ISO ("Grado con cui un insieme di caratteristiche intrinseche soddisfano i requisiti", ISO 9000:2005) non aiuta a definire oggettivamente quanto e come un prodotto alimentare possa essere considerato di qualità. Il concetto di qualità è infatti molto vasto ed include dati oggettivi e soggettivi. Tra i dati oggettivi certo vi è la composizione molecolare degli alimenti e per i chimici, per loro natura interessati alle molecole, la domanda sorge spontanea: si può misurare la qualità di un alimento associandola al contenuto di una particolare sostanza chimica, naturalmente presente o meno?

Tra i parametri di qualità possiamo includere la sicurezza e la qualità nutrizionale. Tali caratteristiche sono spesso facilmente ed oggettivamente misurabili in relazione a composti chimici, poiché sono spesso associate al contenuto di una particolare sostanza spesso normata per legge o comunque identificata con valori ottimali generalmente riconosciuti. Per esempio, la presenza (o meglio l'assenza) di pesticidi in un alimento è un parametro di qualità facilmente misurabile e certificabile. Analogamente, il contenuto di acidi grassi

insaturi omega 3 ed omega 6 può essere facilmente misurato e confrontato con i valori ottimali. Si tratta quindi in questi casi di una qualità "oggettiva" che può essere facilmente misurata e certificata. Accanto ad essa esiste una qualità totalmente soggettiva, di difficile, se non impossibile, misurazione. Si tratta della qualità collegata alle caratteristiche che potremmo definire edonistiche, in primo luogo le proprietà sensoriali di un alimento (l'essere o non essere "buono" nel senso più tradizionale del termine), che sono molto variabili da persona a persona. Inoltre un alimento ha caratteristiche di qualità spesso legate alla percezione psicologica e sociale. Basti pensare ad esempio a quanto l'essere considerato un alimento "nobile" contribuisca alla fama del caviale come alimento di qualità. Anche se alcuni tentativi sono stati fatti, in particolare per quel che riguarda le proprietà sensoriali, tutte queste proprietà sono difficilmente oggettivabili mediante la misura del contenuto di composti specifici. Vi è però un ulteriore aspetto della qualità, che è quella che prenderemo in considerazione in questo articolo, che potremmo definire l'autenticità e la genuinità dei prodotti alimentari, intesa come l'adesione a specifiche caratteristiche legate alla loro produzione, quali luogo di produzione, ingredienti, metodologie di processo. Vini ottenuti da uve selezionate, formaggi e prosciutti DOP stagionati, formaggi prodotti a partire dal latte di specie ben definite (come pe-

corino o mozzarella di bufala), olio d'oliva ottenuto da particolari varietà di olive, prodotti tipici locali, passate prodotte a partire da una varietà di pomodoro ben definita, sono solo alcuni degli esempi di caratteristiche percepite dal consumatore come parametri di qualità, spesso, giustamente o meno, anche percepiti come superiori dal punto di vista sensoriale (cioè "più buoni"). Quando questi *claim* di "autenticità" si trovano sull'etichetta, implicitamente il produttore suggerisce al consumatore che queste caratteristiche denotano effettivamente un prodotto superiore, affermazione che spesso si traduce in un maggiore prezzo sul mercato.

Se confrontiamo queste caratteristiche di qualità con le precedenti, la domanda sorge spontanea: è possibile trovare metodi oggettivi per valutare queste caratteristiche di qualità? Nel caso specifico, guardando agli alimenti con l'occhio del chimico, è possibile individuare molecole che fungano da "marcatori" della caratteristica di autenticità vantata in etichetta? O, per dirla in modo più brutale, si possono identificare composti che ci consentano di poter dire se il produttore dichiara il vero oppure il falso (come nel caso piuttosto ovvio della foto di apertura, il "Prosciutto di Parma originale spagnolo")? La risposta è che oggi in molti casi le moderne tecniche di analisi rendono possibile (almeno in teoria) misurare oggettivamente la caratteristica di "autenticità" dichiarata in etichetta, e questa "misurazione della qualità" può essere ottenuta identificando e quantificando molecole organiche contenute nel prodotto alimentare [1]. Le tecniche a disposizione comprendono, per quanto riguarda la separazione dei vari composti, tutte le tecniche cromatografiche, per il loro elevato potere separativo in miscele complesse, e per l'identificazione soprattutto la spettrometria di massa ed in alcuni casi l'NMR, per il loro elevato potere identificativo. Queste tecniche consentono oggi di "vedere" miscele complesse come sono gli alimenti nel fine dettaglio molecolare [2].

Si è oggi quindi in grado, in molti casi, di utilizzare una o più molecole contenute negli alimenti come marcatori di autenticità. Naturalmente determinare questi marcatori non è una misura diretta della qualità, ma semplicemente la conferma o meno che quanto rivendicato dal produttore come *claim* di autenticità sia effettivamente vero. Spetta poi al consumatore decidere, in maniera totalmente soggettiva, se questo parametro per lui corrisponda ad un'effettiva qualità del prodotto o no.

Nella letteratura chimica si trovano sempre più lavori in cui l'approccio molecolare è utilizzato per la determinazione dell'autenticità degli alimenti, anche se occorre prestare una particolare attenzione alla definizione di questi marcatori. In questi casi, due approcci principali possono essere utilizzati: analizzare un gran numero di campioni "autentici" e "falsi" al fine di identificare, senza nessuna ipotesi a priori, molecole che differenzino i due gruppi (potremmo chiamare questo approccio "untargeted analysis"), o alternativamente applicare un approccio "razionale" volto alla determinazione di molecole per le quali esiste un motivo logico ed oggettivo che le possa rendere buoni marcatori ("targeted analysis"). È chiaro che il secondo

metodo sarebbe in genere preferibile, ma ovviamente non sempre è applicabile, per cui molto spesso si utilizzano metodi basati sul primo approccio. In entrambi i casi, ma ovviamente soprattutto nel caso dell'"untargeted analysis", è molto importante assicurarsi che i campioni utilizzati come "training set" siano sufficientemente numerosi da coprire tutta la variabilità dei prodotti autentici (anche in termini di stagionalità di produzione ed intrinseca variabilità legata eventualmente ai prodotti artigianali) e tutta la variabilità dei prodotti non autentici. Tale copertura, come è ovvio attendersi, risulta molto spesso impossibile da realizzare praticamente, esponendo gli approcci basati sulla "untargeted analysis" a non essere sufficientemente adeguati qualora si analizzino campioni estremamente dissimili da quelli utilizzati nella messa a punto del metodo. Perciò, ai fini di una robusta valutazione dell'autenticità del prodotto, sarebbe sempre preferibile non solo osservare che una particolare molecola possa funzionare come un marcatore, ma anche compiere uno sforzo al fine di spiegare perché sia così. L'"untargeted analysis" ha però anche l'ovvio vantaggio di prendere in considerazione ed eventualmente utilizzare un elevato numero di composti organici, rendendo quindi più robusta, a patto di usare adeguati strumenti statistici, l'autenticazione.

La molecola che possiede un posto di onore nella classifica di quelle utilizzate come marcatori di autenticità è ovviamente il DNA. Essendo le sequenze di DNA specie-specifiche, ed in molti casi anche varietà-specifiche, è chiaro che l'analisi del DNA può consentire di

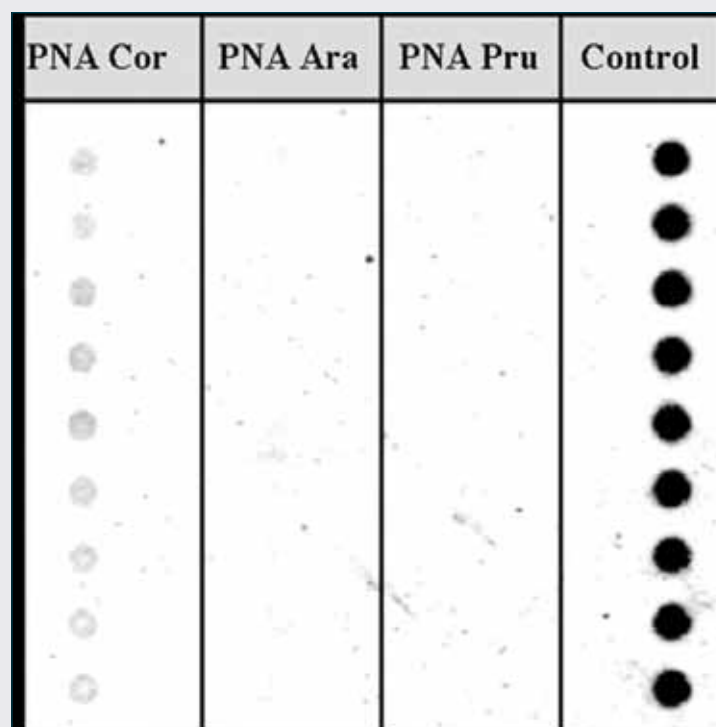


Fig. 1 - Microarray a sonde PNA usato per la rivelazione di DNA di nocciola (cor), arachide (ara) e mandorla (pru), mostrante un segnale specifico per il DNA di nocciola (colonna a sinistra) dopo ibridazione con DNA estratto e amplificato da olio di oliva contenente il 5% di olio di nocciola (riprodotto con il permesso di The Royal Society of Chemistry da S. Sforza et al., *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 211)



identificare con accuratezza le specie animali o vegetali presenti in un prodotto alimentare, consentendo quindi un'identificazione certa dell'autenticità dell'alimento per quanto riguarda le materie prime utilizzate. Inoltre possiede il vantaggio di offrire un'autenticazione basata su un "razionale" estremamente oggettivo e robusto, in quanto legato a precise sequenze genetiche che caratterizzano univocamente l'ingrediente cercato. Per questi motivi, ed anche per la stabilità chimica della molecola ai diversi processi tecnologici in uso nella produzione alimentare, l'analisi del DNA è uno dei più potenti mezzi di autenticazione oggi a disposizione. Esistono numerose tecniche di analisi che possono essere applicate, ma tutte quelle più utilizzate oggi si basano sull'amplificazione del DNA tramite un processo noto come Reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR), amplificazione che può essere casuale (ottenendo un'impronta digitale genetica) o specifica, seguita da un'analisi delle sequenze amplificate tramite diverse tecniche, tra cui principalmente elettroforesi [3].

È quindi possibile confrontare "impronte digitali" di diversi DNA o verificare la presenza di ben determinate sequenze note per essere specifiche, per determinare la presenza o meno di materie prime diverse da quelle dichiarate (Fig. 1).

Diversi promettenti studi oggi sono in corso per ottenere una rivelazione del DNA senza preventiva amplificazione, utilizzando tecniche ultrasensibili.

L'analisi del DNA presenta tuttavia alcuni svantaggi intrinseci, il più importante dei quali è che ovviamente non può essere applicata per quanto riguarda l'autenticazione di processo o di origine geografica, essendo limitata ad un'autenticazione genetica degli ingredienti utilizzati. La stessa varietà di pomodoro coltivata in Italia ed in Cina potrebbe risultare molto diversa organoletticamente ed anche morfologicamente, in base alle caratteristiche agronomiche dei due luoghi di produzione, ma un'analisi del DNA indicherebbe (sbagliando) che si tratta sempre dello stesso prodotto. Una seconda limitazione riguarda la possibilità di quantificare accuratamente l'ingrediente cercato. Il processo di amplificazione tramite PCR ovviamente altera, incrementandolo esponenzialmente, il contenuto iniziale di DNA.

Tramite un processo chiamato Real Time PCR è possibile, verificando quanti passaggi di amplificazione sono necessari per superare una certa soglia di rivelabilità, determinare il contenuto quantitativo del DNA, ma tale procedura richiede una calibrazione accurata.

Inoltre, anche ammettendo di riuscire a quantificare accuratamente il DNA (e per questo le tecniche ultrasensibili che riescono a fare a meno della PCR saranno estremamente preziose in futuro), la relazione tra quantità di DNA e quantità di ingrediente ad esso collegato è comunque estremamente variabile nei prodotti alimentari.

Nonostante queste limitazioni, in alcuni casi tuttavia l'analisi del DNA è diventata la tecnica di scelta, anche dal punto di vista legislativo, per l'autenticazione di prodotto, come ad esempio nel caso degli organismi geneticamente modificati (OGM).

Il regolamento CE 1831/2003 ammette come limite nei prodotti OGM-free una percentuale di OGM non superiore allo 0,9% ed il rispetto di tale soglia è in genere verificato tramite un'analisi eseguita mediante Real Time PCR, che consente di autenticare il prodotto appunto come OGM-free.

Naturalmente una valutazione oggettiva e razionale di autenticità può essere eseguita anche con la determinazione di sequenze proteiche. Le sequenze proteiche sono infatti geneticamente determinate e quindi contengono la stessa valenza informativa del DNA. In più, nei campioni biologici e quindi anche negli alimenti, le proteine sono più abbondanti del DNA e si prestano maggiormente ad un'analisi diretta, anche molto più accurata dal punto di vista quantitativo. Tuttavia la determinazione delle proteine come tali, essendo composti molto variabili per dimensioni e polarità, pone limiti oggettivi alle possibilità analitiche.

Anche utilizzando la spettrometria di massa, la tecnica per eccellenza per l'identificazione di molecole organiche, i risultati possono essere limitati, poiché la spettrometria di massa risulta poco sensibile per composti ad alto peso molecolare. Una maniera piuttosto ovvia di aggirare tale problema consiste nell'analizzare sequenze peptidi-



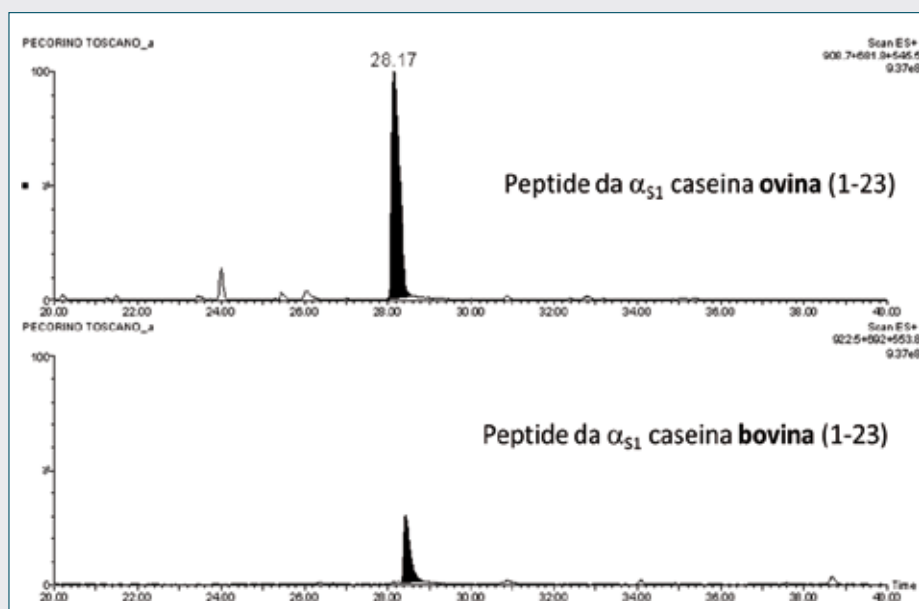


Fig. 2 - Cromatogrammi LC/MS ottenuti monitorando specificamente i peptidi corrispondenti alla porzione 1-23 dell' α S1 caseina bovina ed ovina, in un campione ottenuto da un pecorino DOP presente nel commercio. La presenza del peptide proveniente dalla caseina bovina indica l'uso (non dichiarato in etichetta) di latte vaccino (adattato con il permesso dell'American Chemical Society da S. Sforza *et al.*, in *Progress in Authentication of Food and Wine*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington (DC, USA), 2011, **1081**, 215)

che specifiche, piuttosto che l'intera proteina. Tali sequenze peptidiche possono essere generate per idrolisi enzimatica prima dell'analisi, o, in alternativa, essere già naturalmente presenti a causa di processi proteolitici presenti nell'alimento, come nel formaggio o nei salumi stagionati. L'analisi qualitativa e quantitativa dei peptidi può essere agevolmente eseguita mediante tecniche ifenate LC/MS [4]. L'esempio del formaggio è particolarmente caratteristico. Le proteine più abbondanti presenti nei formaggi sono le caseine, che precipitano nella cagliata. Durante la produzione del formaggio, le caseine vengono in parte scisse per proteolisi in peptidi e amminoacidi. Di conseguenza, ogni formaggio è una miscela complessa di amminoacidi, peptidi e proteine e l'esatta composizione di questa miscela è strettamente correlata agli ingredienti, alla tecnologia di produzione, alla flora batterica, al tempo di maturazione, tutti parametri di autenticità per i formaggi. Per esempio, le caseine di vacca e di pecora, seppur molto simili, hanno alcuni amminoacidi che le differenziano, per cui i peptidi che si formano durante il processo proteolitico che contengono questi amminoacidi sono diversi per sequenza, e quindi per massa molecolare e, in uno spettrometro di massa, generano diversi frammenti caratteristici, per cui possono essere differenzialmente rivelati in un sistema LC/MS.

È chiaro quindi che se in un formaggio dichiarato prodotto da puro latte di pecora si trova un peptide avente una sequenza tipica di una parte della caseina vaccina, tale peptide deriva da un'aggiunta di latte vaccino (Fig. 2). Peraltro, il confronto tra due peptidi omologhi provenienti da specie diverse ci indica anche, in maniera quantitativamente accurata, la percentuale di aggiunta di latte non dichiarato [5]. Poiché la composizione della frazione peptidica ed amminoacidi-

ca non è costante in un formaggio, ma si modifica continuamente al procedere della stagionatura, appare evidente che uno studio attento di questa frazione, accompagnato da una calibrazione accurata, permette anche di ottenere una stima piuttosto precisa del tempo di stagionatura, un parametro di autenticità che, ad esempio nei formaggi a pasta dura (quali Parmigiano-Reggiano e Grana Padano), incide fortemente sul costo commerciale del prodotto ed è in genere considerato un parametro di qualità.

Un esempio analogo, ma basato sulla generazione pre-analisi di peptidi specifici che possano fungere da marcatori molecolari, riguarda la presenza di grano tenero in semola di grano duro, presenza che per la legge italiana non può superare il 3%. L'estrazione delle gliadine seguita dalla loro digestione enzimatica *in vitro* genera peptidi caratteristici, alcuni in comune tra grano tenero e grano duro, altri presenti solo nel grano tenero, che possono essere agevolmente analizzati mediante LC/MS. Questi peptidi possono essere

utilizzati, tramite opportuna calibrazione del rapporto peptidi specifici/peptidi comuni, come marcatori della quantità di grano tenero in grano duro [6].

Di fianco a DNA e proteine/peptidi, vi sono numerose molecole organiche che possono fungere da marcatori di autenticità degli alimenti.

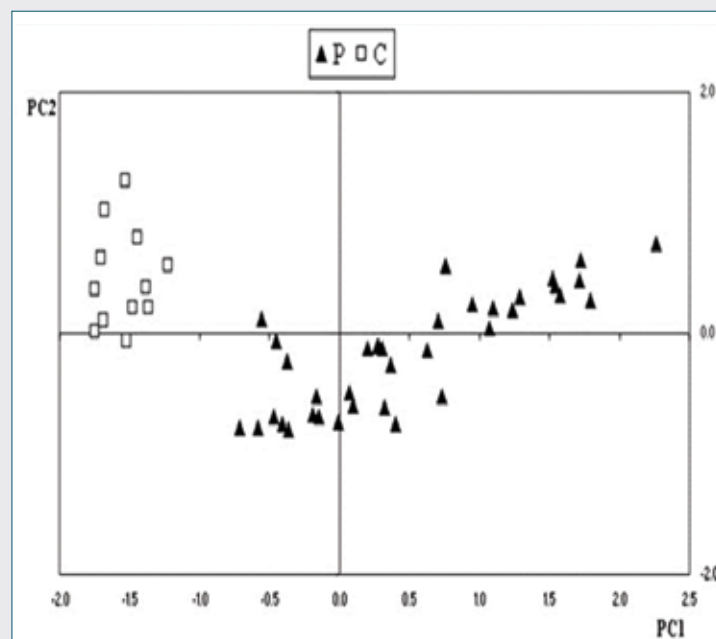


Fig. 3 - Score plots di un'analisi PCA ottenuta processando le integrazioni dei segnali NMR protonici (ottenuti con sequenza eCPMG con probe HRMAS) su campioni di mozzarelle di bufala prodotte a Paestum (P-triangoli) o a Caserta (C-quadrati), che evidenzia la possibilità di discriminare il luogo di produzione (riprodotto con il permesso di Elsevier da P. Mazzeia, A. Piccolo, *Food Chemistry*, 2012, **132**, 1620)

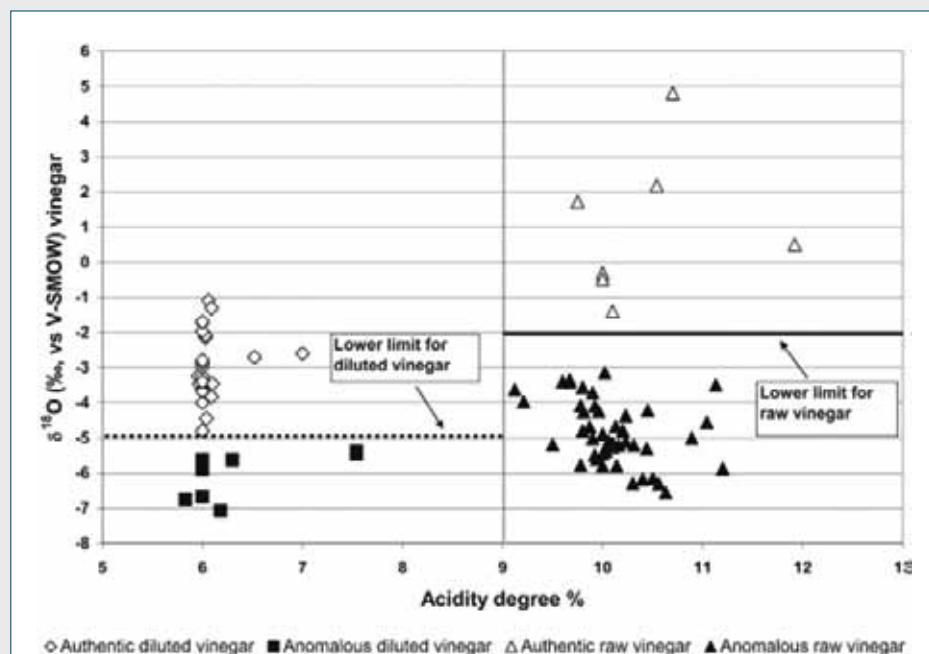


Fig. 4 - Valori $\delta^{18}\text{O}$ di 92 campioni di aceto sospetti importati sul mercato italiano. I valori evidenziati per i campioni sulla destra (teoricamente non diluiti) indicano che la maggior parte di questi campioni (quelli evidenziati da triangoli neri) sono in realtà stati ottenuti da una diluizione con acqua di uva passa o mosto concentrato, quindi non sono autentici (riprodotto con il permesso di Elsevier da F. Camin *et al.*, *Food Control*, 2013, **29**, 207)

Terpeni nei prodotti agrumari, steroli negli oli di oliva, componenti volatili nei vini, sono solo alcuni degli esempi di molecole organiche naturalmente presenti negli alimenti che possono essere utilizzate a fini autentificativi.

Questi composti, che generalmente ricadono nella categoria dei metaboliti secondari, possono essere determinati attraverso strumentazioni cromatografiche eventualmente ifenate con spettrometria di massa (LC/MS o GC/MS), ma in questo campo sta anche acquistando una rilevanza sempre maggiore la risonanza magnetica nucleare (NMR), che sta assumendo sempre di più, come la spettrometria di massa nel campo della proteomica, un ruolo centrale in quella che viene chiamata la metabolomica.

La metabolomica è il campo per eccellenza di applicazione dell'approccio basato sull'"untargeted analysis" e l'elevato contenuto informativo degli spettri NMR li rende particolarmente adatti, tramite l'utilizzo di opportuni software statistici, alla creazione di banche dati da utilizzarsi per l'autenticazione di alimenti, come ad esempio l'origine botanica del miele [7] o il luogo di produzione di formaggi DOP (Fig. 3).

Un ultimo commento sull'uso delle molecole organiche a fini autentificativi va fatto sugli isotopi. L'abbondanza relativa di diversi isotopi nei composti organici è strettamente legata al luogo di origine, agli ingredienti ed alle metodologie di produzione, e, tramite tecniche sensibili, ancora una volta basate su MS e NMR, è possibile stabilire le sottili differenze di abbondanza isotopica relativa e determinare, sempre tramite utilizzo di banche dati opportune, l'autenticità dei prodotti alimentari (Fig. 4). Il successo della tecnica dipende dall'ampiezza dei campioni utilizzati come "training set", che devono coprire teoricamente tutta la variabilità intrinseca nei prodotti autentici e quindi dalla robustezza della banca dati utilizzata come riferimento. Quando questa condizione risulti soddisfatta, l'analisi isotopica consente di determinare con ottima accuratezza diversi parametri di autenticità [8].

In conclusione, ogni alimento è ricco di molecole organiche di varia natura, ognuna delle quali è collegata alla "storia" dell'alimento stesso. Tramite l'utilizzo di tecniche analitiche e di strumenti

statistici opportuni è oggi possibile estrarre dalle molecole questa "storia" ed utilizzarla per determinare l'autenticità dell'alimento stesso. Il chimico può quindi affiancare e supportare il consumatore nella sua scelta di prodotti alimentari veramente "autentici" ed aiutare le aziende produttrici nelle procedure di controllo qualità.

Bibliografia

- [1] S. Sforza, *Food Authentication using Bioorganic Molecules*, Destech Publisher, Lancaster, PA, USA, 2013.
- [2] S. Primrose *et al.*, *Trends Food Sci Tech.*, 2010, **21**, 582.
- [3] R. Corradini, R. Marchelli, in *Food Authentication using Bioorganic Molecules*, Destech Publisher, Lancaster, PA, USA, 2013, 1.
- [4] V. di Stefano *et al.*, *J. Chrom. A*, 2013, **1259**, 74.
- [5] S. Sforza *et al.*, *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 1072.
- [6] B. Prandi *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 2909.
- [7] E. Schievano *et al.*, *Metabolomics*, 2012, **8**, 679.
- [8] G. Vinci *et al.*, *J. Sci. Food Agr.*, 2013, **93**, 439.

ABSTRACT

The Molecules of Authenticity

The authenticity of a given food can be objectively assessed by using organic compounds present in it as "molecular markers". DNA, proteins, peptides, secondary metabolites, can nowadays be determined with high sensitivity and accuracy by chromatographic techniques, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, allowing to determine food composition at a level of molecular detail impossible only few years ago. The molecules present in a given food tell its story and allow to certify its authenticity.