

Panoramica delle metodologie e degli strumenti analitici disponibili per la valutazione dell'autenticità dei cereali e derivati

Francesca Melini e Marina Carcea

Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CRA-NUT)
Consiglio per la Ricerca e la Nutrizione (CRA)
Roma (Italia)

- L'autenticità dei cereali e la filiera produttiva -

I cereali hanno una filiera produttiva lunga con passaggi di prima e seconda trasformazione



Semente



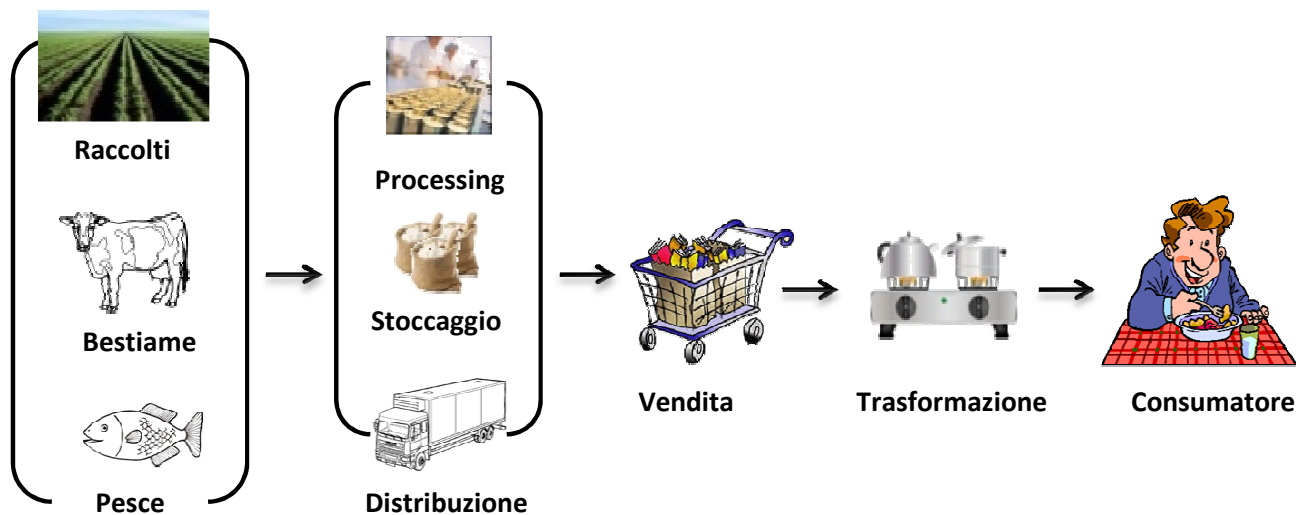
Prodotti di prima trasformazione



Prodotti di seconda trasformazione

- L'autenticità dei cereali e la filiera produttiva -

Filiera agroalimentare,
sempre più
complessa e articolata



Globalizzazione



A Multinational Loaf

Many American food products are a mix of global ingredients, as foreign supplies often offer a cheaper alternative to those made in the United States. While the source of ingredients is typically kept private by companies, Sara Lee revealed the supplying countries for its new whole grain white bread. Nearly a third of the list came from foreign sources, meaning Sara Lee, along with many large food companies, faces the increasing task of ensuring that foreign suppliers meet the best possible safety standards.

AMY SCHOENFELD

INGREDIENTS: ENRICHED BLEACHED FLOUR (WHEAT FLOUR, MALTED BARLEY FLOUR, NIACIN, IRON, THIAMIN MONONITRATE (VITAMIN B1), RIBOFLAVIN (VITAMIN B2), FOLIC ACID), WATER, WHOLE GRAINS (WHOLE WHEAT FLOUR, BROWN RICE FLOUR (RICE FLOUR, RICE BRAN)), HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP, WHEY, WHEAT, GLUTEN, YEAST, CELLULOSE. CONTAINS 2% OR LESS OF EACH OF THE FOLLOWING: HONEY, CALCIUM SULFATE, VEGETABLE OIL (SOYBEAN AND/OR OCTOINISED OILS), SALT, BUTTER (CREAM, SALT), DOUGH CONDITIONERS (MAY CONTAIN ONE OR MORE OF THE FOLLOWING: MONO- AND DIGLYCERIDES, ETHXYLATED MONO- AND DIGLYCERIDES, ASCORBIC ACID, ENZYMES, AZODICARBONAMIDE), GUAR GUM, CALCIUM PROPIONATE (PRESERVATIVE), DISTILLED VINEGAR, YEAST NUTRIENTS (MONOCALCIUM PHOSPHATE, CALCIUM SULFATE, AMMONIUM SULFATE), CORN STARCH, NATURAL FLAVOR, BETA-CAROTENE (COLOR), VITAMIN D3, SOY LECITHIN, SOY FLOUR.

GLUEN GUM
India



Guar gum is used to keep bread moist. This white powder is ground from guar plant seed pods primarily grown in India.

CALCIUM PROPIONATE
Netherlands



Calcium propionate is a mold inhibitor. This preservative is manufactured in many countries.

HONEY
China, Vietnam, Brazil, Uruguay, India, Canada, Mexico, Argentina



Honey is increasingly used as a natural sweetener, and domestic supplies can fall short. It is produced by small-scale beekeepers, so Sara Lee purchases it from multiple countries to meet its needs.

FLOUR ENRICHMENTS
China



Flour enrichments are required to replenish the vitamins lost in the milling process. According to Sara Lee, the industry has consolidated, limiting its options for suppliers.

BETA-CAROTENE
Switzerland



Beta-carotene is added to provide a color to the bread and crust. This artificial coloring is available from many countries.

VITAMIN D3
China

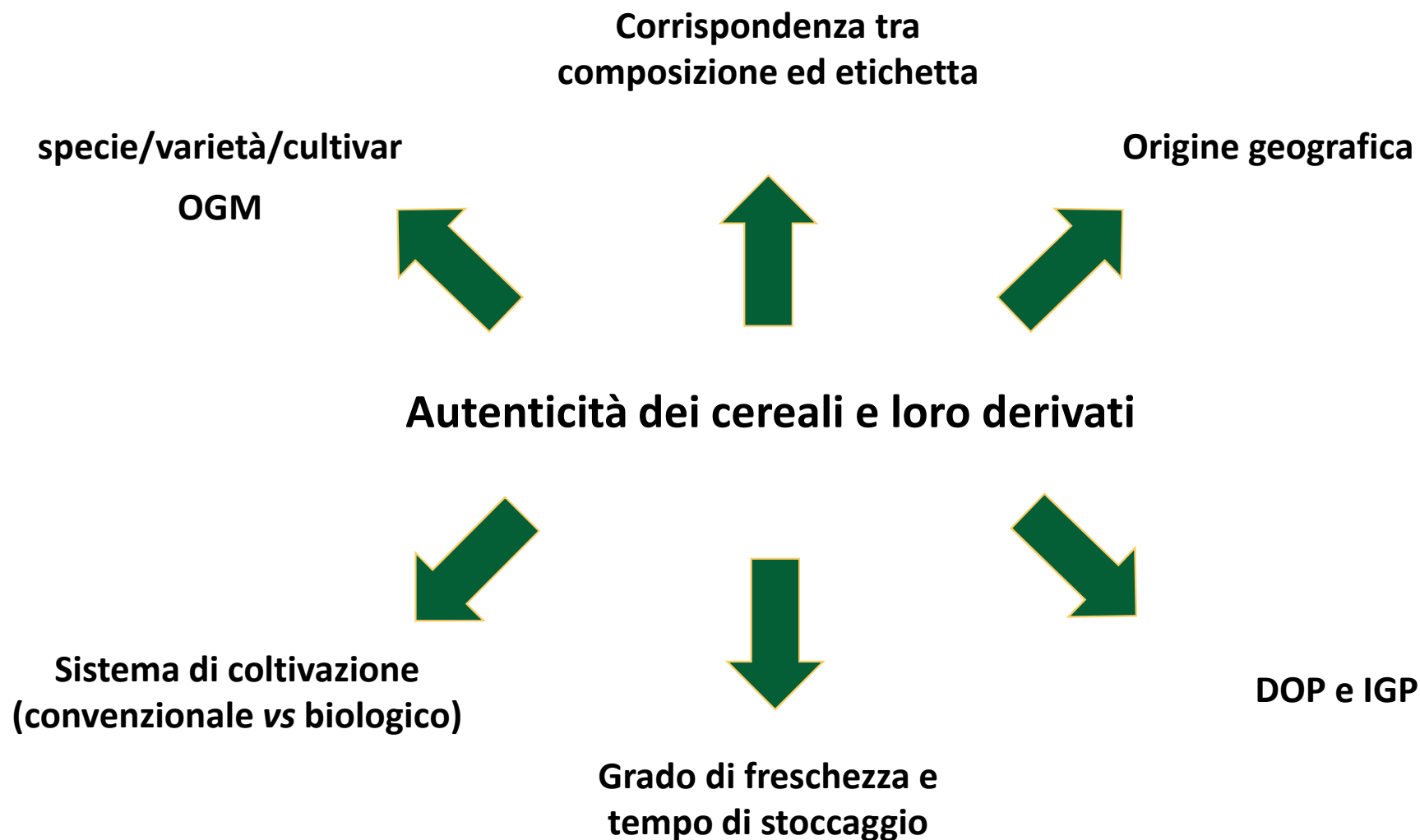


Vitamin D3 is a supplement used to aid in calcium absorption. China is one of the leading suppliers of vitamin.

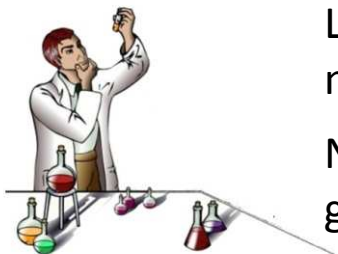
WHEAT GLUTEN
France, Poland, Russia, Netherlands, Australia



Wheat gluten is added to the bread to help keep its structure and shape. Sara Lee uses many suppliers to meet its needs.



- L'autenticità dei cereali e le metodologie -

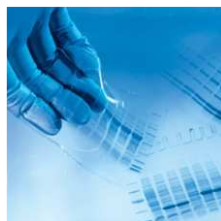


La garanzia di autenticità sia a livello di semente che di alimento processato è passata negli ultimi decenni per vie legislative e amministrative, ma anche per vie analitiche.

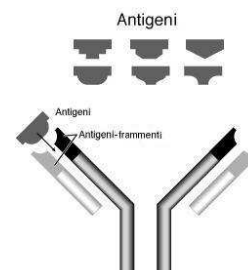
Negli ultimi decenni la comunità scientifica ha lavorato all'individuazione di metodi in grado di stabilire l'autenticità lungo tutta la filiera cerealicola.



Metodi composizionali



Metodi elettroforetici



Metodi immunochimici



Metodi molecolari



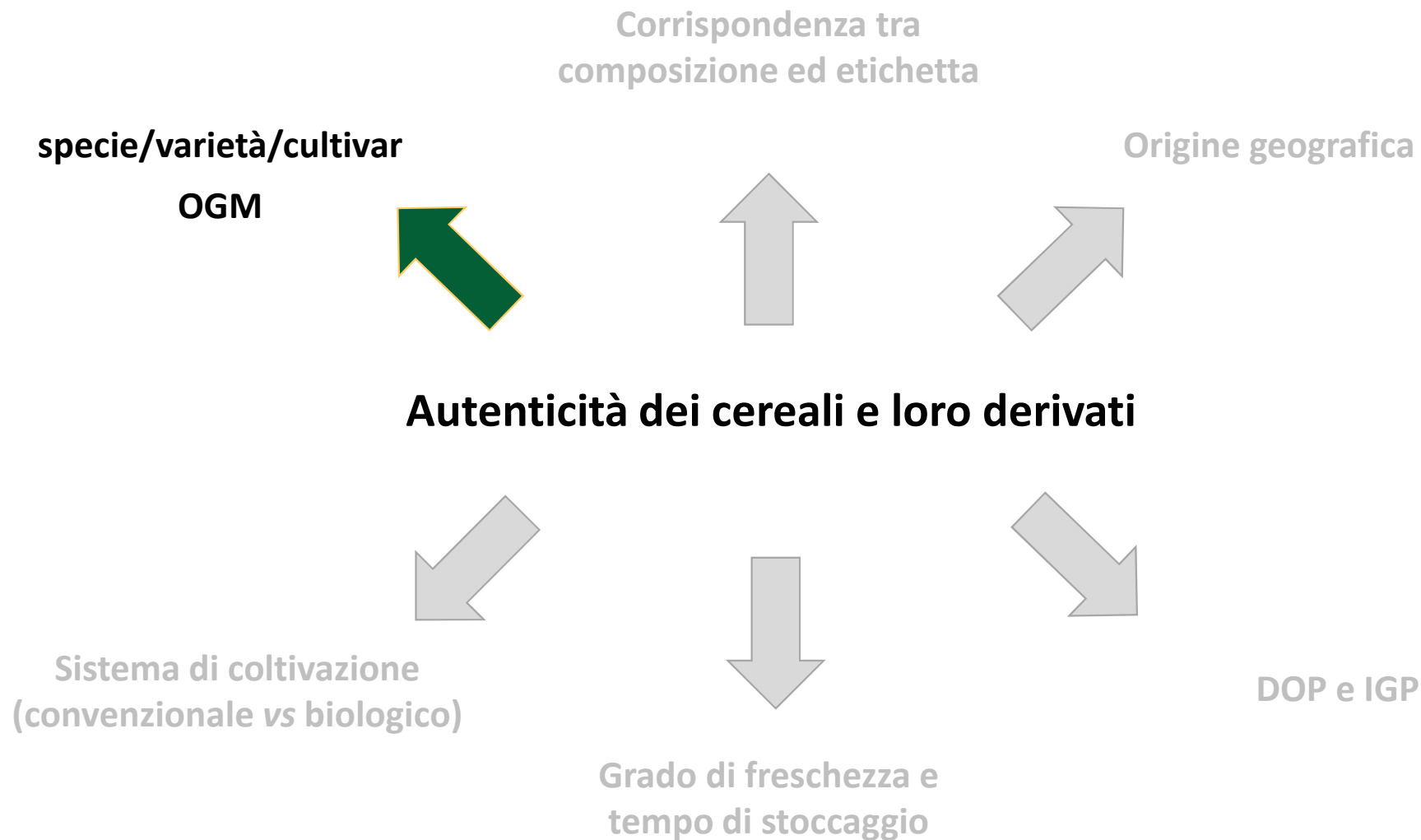
**Metodi di separazione
(HPLC)**



**Spettrometria di massa
(IRMS, ICP-MS)**



**Spettroscopia
(NMR, IR, NIR, MIR)**





1. Analisi ottica (*materie prime*)

- l'operatore discrimina i chicchi di grano duro da quelli di grano tenero: i chicchi del grano duro sono più larghi, con una forma più allungata, endosperma più duro, più vitreo e senza barbetta.

2. Test della tirosina (*materie prime*)

Principio: attività delle polifenolossidasi (elevata nel *T. aestivum* e pressoché assente nel *T. durum*).

3. Comuni metodi composizionali (*materie prime e prodotti di prima trasformazione*)

- Fisici
- Gravimetrici
- Enzimatici
- Tritrimetrici
- Volumetrici
- Colorimetrici



Hardness o durezza delle cariossidi, contenuto proteico, qualità delle proteine, glutine, indice di caduta di Hagberg o Falling number, amido, lipidi, colore.

Altri parametri quali: acidità, attività α -amilasica, ceneri, cloridi, lipidi grezzi, fibra, perossidasi, viscosità dell'amido, steroli, vetrosità, proprietà reologiche.

4. Metodi elettroforetici (*materie prime e prodotti di prima trasformazione*)

- ICC Standard 143: *Wheat - Identification of Varieties by Electrophoresis*
- AACC 06-10: *Admixture of Rye and Wheat Flours*
- RACI 08-01: *Electrophoretic identification of cereal varieties by Acid Gradient PAGE*
- RACI 08-03: *Electrophoretic identification of cereal varieties by SDS-PAGE*

5. Metodi molecolari

Utili per differenziare

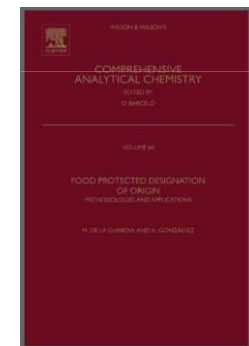
- le **varietà moderne di frumento** (*T.aestivum* e *T.durum*)
- le **varietà antiche di frumento** (farro e frumento Kamut)

- **identificazione varietale (Basmati vs non Basmati)**
 - misurazione semi-quantitativa della quantità presente in una miscela
 - *letteratura*: utilizzo combinato del metodo Indel adattato al Bioanalyzer, con cui si è in grado di identificare riso Basmati presenti in un campione.

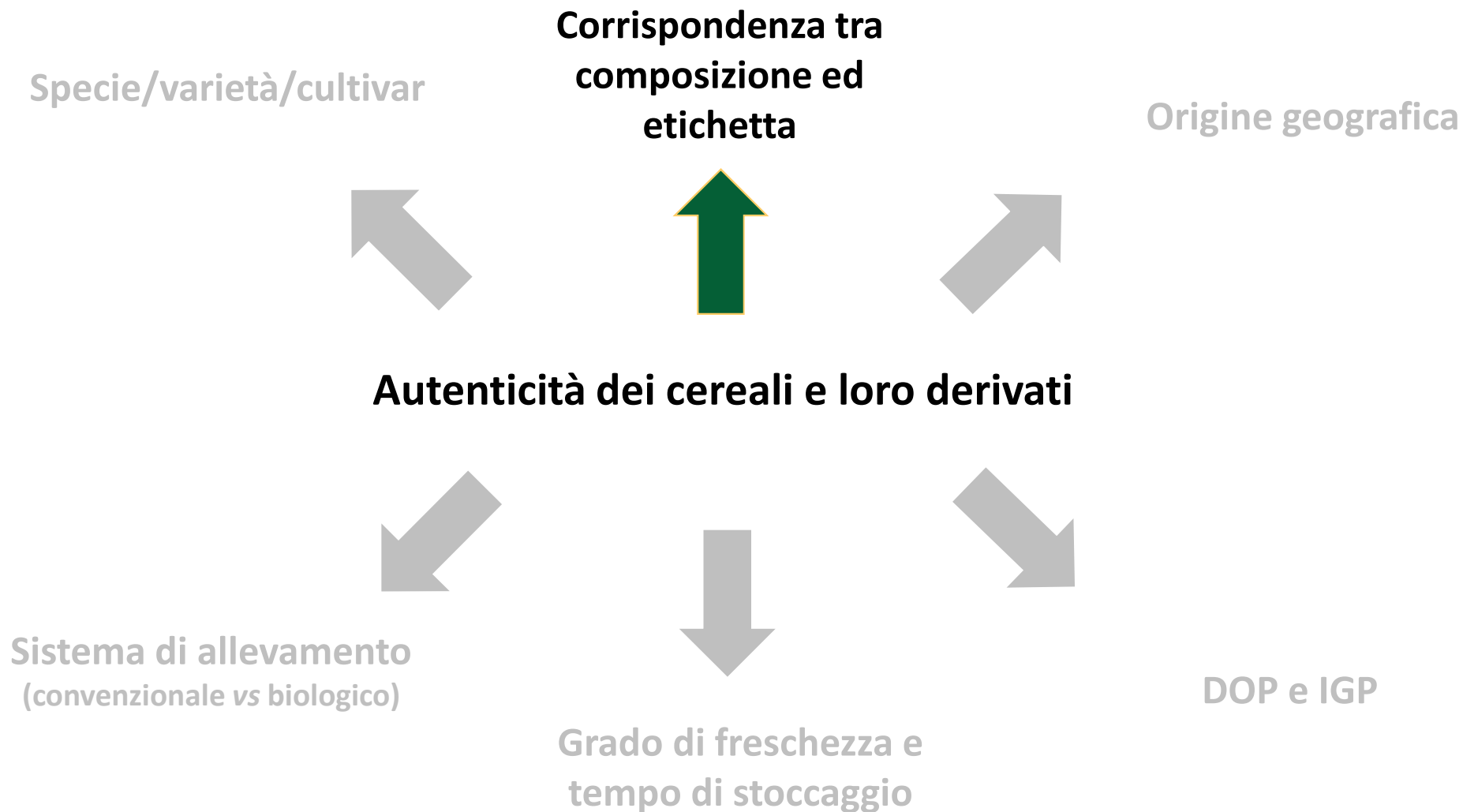
- **identificazione di OGM**, dato che le piante transgeniche contengono nuovi tratti genetici o geni marcatori specifici.

6. Spettroscopia (*materie prime*)

Uso di tecniche di **Spettroscopia del vicino infrarosso (NIR)** combinate con analisi chemometrica consentono di discriminare varietà Basmati da varietà non-Basmati.



Food Protected Designation of Origin
Methodologies and Applications





Gazzetta Ufficiale n. 117 del 22-05-2001

Decreto del Presidente della Repubblica 9 febbraio 2001, n.187

Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari

1. Sono denominati "pasta di semola di grano duro" e "pasta di semolato di grano duro" i prodotti ottenuti dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di impasti preparati rispettivamente ed esclusivamente:

- a) con semola di grano duro ed acqua;
- b) con semolato di grano duro ed acqua.



è tollerata la presenza di farine di grano tenero in misura non superiore al 3%

2. E' denominato "pasta di semola integrale di grano duro" il prodotto ottenuto dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di impasto preparato esclusivamente con semola integrale di grano duro ed acqua.





Riconoscimento e dosaggio degli sfarinati di frumento tenero negli sfarinati di frumento duro e nelle paste alimentari

- **Metodo elettroforetico di Resmini (1968)**
- **Metodo elettroforetico per focalizzazione ionica (Resmini-De Bernardi)**
- **Metodo immunochimico Cantagalli-Piazzì**

**DECRETO MINISTERIALE 29 ottobre 1979
pubblicato sulla G.U.R.I. del 5 gennaio 1980**

Metodo elettroforetico per focalizzazione ionica (Resmini-De Bernardi)

Nasce come seguito del metodo elettroforetico Resmini (1968): separazione frazione albuminica mediante precipitazione con solfato di ammonio e successiva analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide.

Fasi di estrazione e purificazione del campione prima dell'analisi elettroforetica semplificate.

- **matrice:** frumento o sfarinati o paste alimentari
- **principio:** separazione e riconoscimento mediante elettroforesi su strato sottile (gel-focalizzazione ionica in TLC) delle albumine caratteristiche delle due specie di frumento.

Metodo immunochimico Cantagalli-Piazzì

- **matrice:** frumento o sfarinati o paste alimentari
- **principio:** reazione di immunoprecipitazione in gel di agarosio quando la frazione proteica specifica del frumento tenero (derivante dal genoma AABBDD caratteristico del *T. aestivum*) e contenuta nell'estratto salino di sfarinati o paste alimentari, viene messa a contatto con un siero specifico anti-frumento tenero. [Antigene viene riconosciuto da uno specifico anticorpo.]
- gli estratti ottenuti da sfarinati di frumento duro non hanno alcuna reazione di immunoprecipitazione con il siero anti-frumento tenero

Kit immunochimici: Durotest®

- **principio:** un anticorpo monoclonale specifico esclusivamente per la proteina friabilina presente solo nel frumento tenero → **in presenza di frumento tenero in sfarinati di duro si forma un complesso tra un anticorpo e la proteina che in presenza di un reagente cromoforo assume una colorazione blu**
- il grado di colorazione del campione è proporzionale alla percentuale di frumento tenero, la quale è stimata per confronto con uno standard di frumento tenero fornendo così un dato semi-quantitativo.

Tecniche di separazione (HPLC)

Metodi basati sulla determinazione di

- frazioni proteiche
- frazione sterolica

Introduzione delle alte temperature (> 70°C) nel processo produttivo della pasta

→ i metodi hanno parzialmente perso la loro importanza, data la denaturazione delle proteine

Metodi molecolari (PCR)

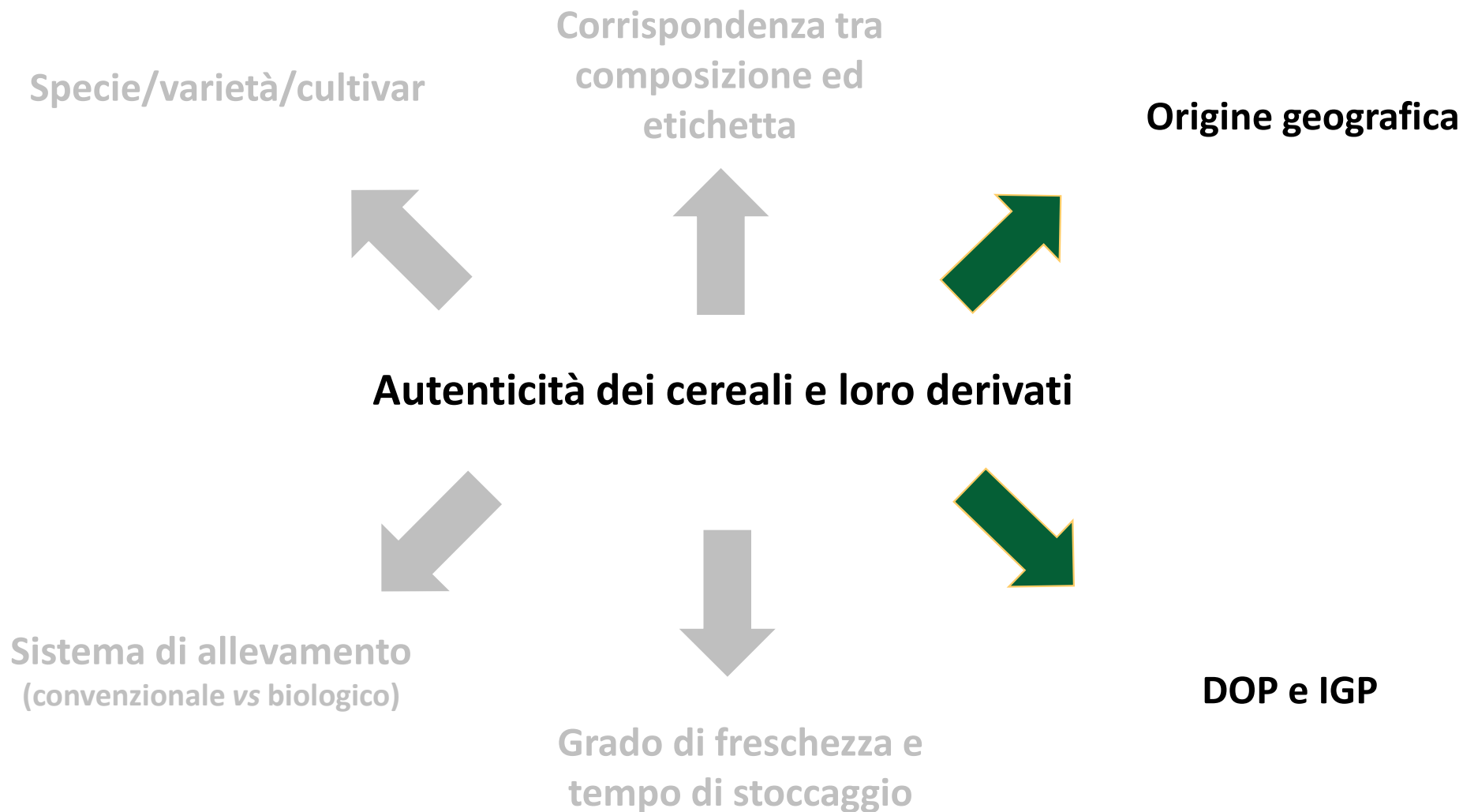
La termostabilità del DNA
L'uso di tecniche di PCR

1. contraddistinguono in modo caratteristico e inequivocabile il tratto di cromosoma con il quale si identificano
2. consentono di avere **marcatori molecolari** utili per l'identificazione di eventuali adulterazioni



Vantaggi:

- *il DNA: maggiore resistenza termica rispetto alle proteine. La degradazione indotta dal trattamento termico lascia frammenti di sufficiente lunghezza e integrità per l'analisi PCR.*
- *sono necessari piccolissimi quantitativi di DNA per una analisi accurata di adulteranti presenti anche a livelli molto bassi*



Parametri "analitici" indicatori della provenienza geografica (markers):

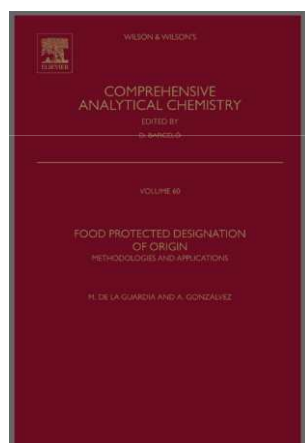
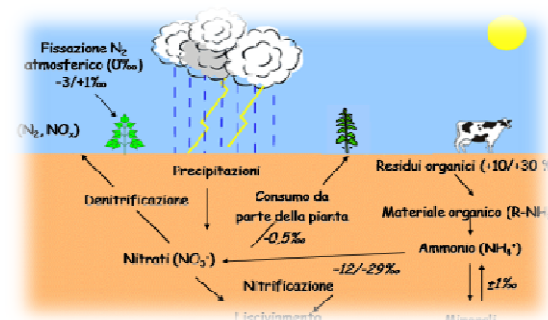
- i) indicatori diretti o primari: variabili che mettono in relazione alcune caratteristiche chimiche dell'alimento con le stesse caratteristiche misurate nel territorio
(i.e. **speciazione isotopica** ed elaborazione dei dati con statistica multivariata)
- ii) indicatori indiretti o secondari: legati alle caratteristiche compositive dell'alimento e ai processi di trasformazione. Essi consentono di classificare come "simili" i prodotti della stessa provenienza d'origine o protetti da denominazione d'origine, distinguendoli così da tutti gli altri
(i.e. **Risonanza Magnetica Nucleare**).

La composizione isotopica delle specie vegetali fornisce un'importante informazione sull'origine del prodotto.



- Le peculiarità geochimiche del suolo danno un contributo importante alle caratteristiche composizionali del prodotto finale in termini di macronutrienti, micronutrienti essenziali e non essenziali;
- Le condizioni climatiche e la quota di coltivazione influiscono sul frazionamento degli isotopi stabili leggeri caratterizzando la zona di provenienza.

- Rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
- Rapporti isotopici $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$
- Rapporti isotopici $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$



Discriminazione dell'origine geografica del riso

La spettrometria di massa *Isotope Ratio Mass Spectrometry* (IRMS) misura i rapporti isotopici degli elementi leggeri (H, O, C, N, S);

Per gli elementi pesanti (Pb, Sr) sono invece utilizzate la tecnica *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry* (ICP-MS) e la tecnica *Thermal Ionization Mass Spectrometry* (TIMS).



Spettrometria di massa
(IRMS, ICP-MS)

Food Protected Designation of Origin
Methodologies and Applications



**Spettroscopia
(NMR, IR, NIR, MIR)**

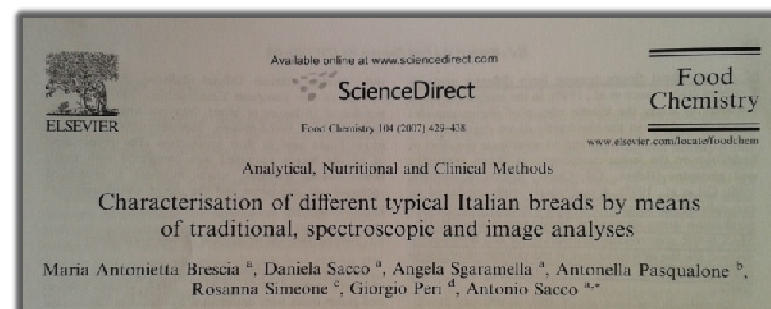
Determinazione del profilo metabolico di frumenti duri di differente origine geografica

La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è stata applicata quale metodica analitica nell'analisi della frazione dei lipidi non legati delle farine esaminate per risalire all'individuazione dell'origine geografica.

Lo spettro ^1H -NMR (comprendente un elevato numero di segnali a frequenze caratteristiche peculiari del campione in esame) ne costituisce un codice univoco di identificazione (*fingerprinting*).

Discriminazione di pane italiano protetto da marchio DOP e IGP (Genzano e Altamura)

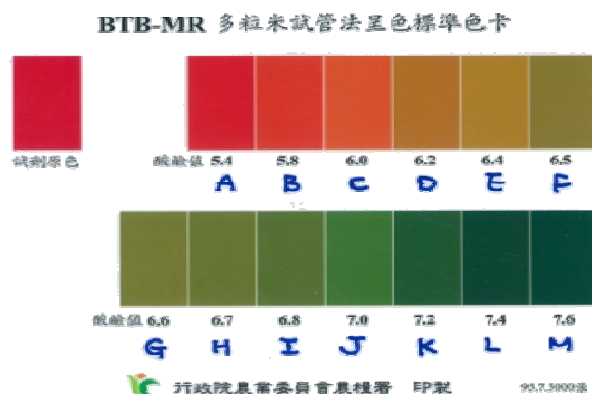
Uso combinato di ^1H HR-MAS NMR [spettroscopia ad alta risoluzione ^1H NMR con angolo magico di spin (HR-MAS)] e la spettrometria di massa isotopica per caratterizzare diversi pani tipici italiani.



1. Metodi meccanici

AACC Method 74-10: *Measurement of Bread Firmness—Compression Test*

2. Metodo in fase di validazione ICC (International Association for Cereal Science and Technology)



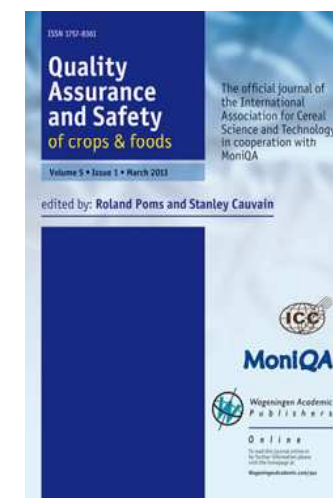
Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain (www.moniqua.org)



- kit per la misurazione rapida del pH

Durante lo stoccaggio il grado di acidità aumenta nel riso → la qualità diminuisce e il colore cambia.

Principio: L'acidità solubile riflette la qualità del riso durante lo stoccaggio e il confronto con una carta colorimetrica (esame visivo) consente di determinare la freschezza della materia prima

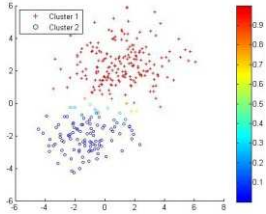


Il “**biologico**” è una certificazione di sistema introdotta nel 1991 con il Regolamento (EEC) N. 2092/91 e attualmente regolamentata dal Regolamento (CE) N. 834/2007 entrato in vigore il 1 gennaio 2009.



Discriminazione di grano coltivato con il sistema convenzionale vs sistema biologico

- studio dei profili metabolici → individuazione di 16 proteine (proteine di riserva, enzimi del metabolismo carboidratico e una perossidasi) che consentono di discriminare i due sistemi di coltivazione
- metodo:
 - estrazione delle proteine
 - IEF e SDS-PAGE
 - Spettrometria di Massa (MS): MALDI-MS



- alcune di queste tecniche necessitano di essere affiancate da metodologie statistiche idonee



- alcuni metodi hanno necessità di essere validati per poterli utilizzare come metodi standard a livello legale



- necessità di banche dati di riferimento, verso le quali stabilire e verificare l'autenticità di un alimento.

**Grazie
per l'attenzione!**