

TECNICA

Studio della Cattolica sul Grana Padano **La metabolomica tutela i nostri formaggi Dop**

di Roberta Sguerrini

Test basati sulla caratterizzazione del "metaboloma" possono aiutarci a identificare la provenienza di un formaggio fino a scoprire la tipologia di dieta della bovina. Una ricerca dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, di Piacenza, fornisce un aiuto prezioso per difendere l'autenticità del prodotto Dop

Il fenomeno dell'adulterazione e della contraffazione dei prodotti made in Italy sta minacciando in modo spudorato le eccellenze gastronomiche e non bastano più le tutele garantite dal marchio e dai Consorzi.

Il Grana Padano Dop è una delle vittime eccellenti ma un aiuto viene dalla scienza: in questo articolo leggeremo come una nuova serie di test basati sulla caratterizzazione del metaboloma possa aiutarci nell'identificare la provenienza di un prodotto fino a scoprire la tipologia di dieta della bovina.

Pionieri di questi test in via di sperimentazione sono i docenti e i ricercatori dell'Università Cattolica del Sacro Cuore (sede di Piacenza dei Dipartimenti di Scienze animali, della

nutrizione e degli alimenti - Diana - e di Scienze e tecnologie alimentari per una filiera agro-alimentare sostenibile - Di-stas) che hanno recentemente pubblicato i risultati delle loro esperienze sulla



prestigiosa rivista *Food Research International* (G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su *Food Research International*, volume 113, novembre 2018).

La contraffazione

Secondo quanto comunicato dai Consorzi di Tutela dei nostri due principali formaggi Dop (Grana Padano e Parmigiano Reggiano) nel 2017 sono state prodotte più di 8 milioni di forme e ne sono state esportate più del 30% (www.granapadano.it; www.parmigiano-reggiano.it), dati

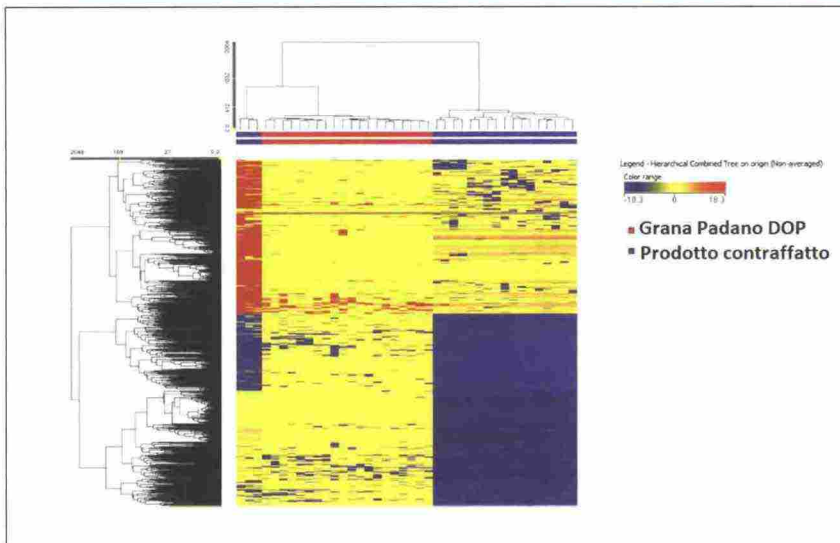
che rendono i due formaggi italiani più popolari al mondo grazie all'alta qualità e alle caratteristiche organolettiche inimitabili oltre che ai valori nutrizionali eccellenti.

Purtroppo, però, data l'ampia platea di consumatori e l'elevato valore riconosciuto ai nostri prodotti, il mercato delle contraffazioni o dei prodotti simili (il cosiddetto fenomeno dell'Italian sounding) rappresentano un grave problema di sleale concorrenza.

Le strategie fraudolente più comuni sono l'impiego di latte proveniente da diversa area

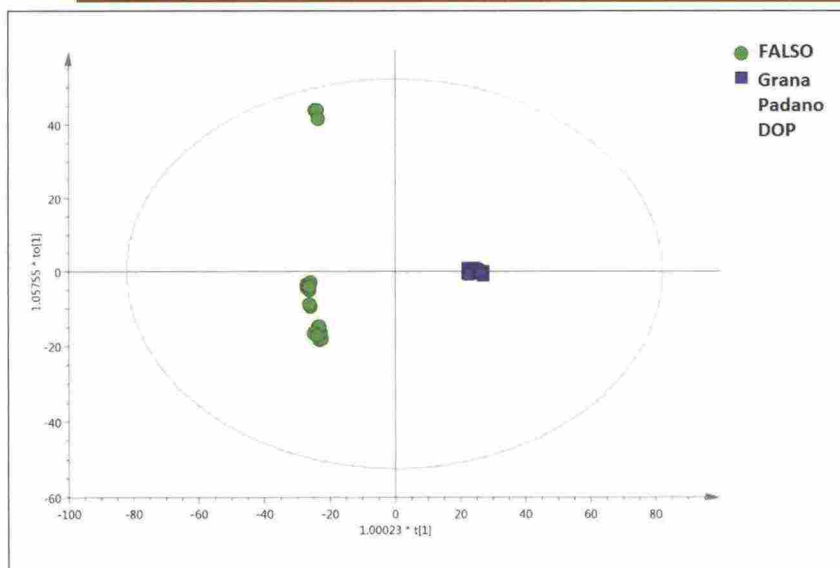
TECNICA

Figura 1 - L'immagine mostra l'analisi di sottogruppi (cluster) di metaboliti appartenenti a due gruppi principali, isolati nei campioni di Grana Padano Dop (in rosso) e nei campioni di prodotti contraffatti (in blu). I profili appartenenti ai due tipi di formaggi (originale e falso Grana Padano) sono chiaramente distinguibili per la distribuzione dei colori.



Da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018

Figura 2 - L'analisi discriminante dei campioni di Grana Padano Dop originale (in blu) e contraffatto (in verde) raggruppa i metaboliti marker in due aree ben distinte.



Da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018

geografica, la somministrazione alle vacche da latte di alimenti foraggi e mangimi (come ad esempio alcune fonti di grassi, farine di colza, ecc.) nonché additivi, il ricorso a tecnologie produttive non prevista dai disciplinari.

Una scienza giovane

Per contrastare questa piaga commerciale sono già molte le strategie e i controlli sistematici sui prodotti attuate dagli organismi di controllo e da Consorzi di tutela oltre che dai Nas, ed in questo contesto i ricercatori della Cattolica hanno dimostrato come una tecnologia innovativa come la metabolomica possa rappresentare uno strumento in più per discriminare il prodotto autentico da quello falso.

Con "analisi metabolomica" si intende lo studio dei metaboliti (i prodotti delle reazioni chimiche) rilevabili in un organismo, un sistema o una sostanza organica. L'insieme dei metaboliti, detto metaboloma, rappresenta una vera e propria impronta digitale "molecolare".

Accoppiando tecniche di cromatografia, spettrometria di massa e sofisticate analisi statistiche, i ricercatori della Cattolica hanno individuato particolari metaboliti che caratterizzano i formaggi italiani Dop, discriminandoli da altri non coerenti con le rigorose procedure dettate dal disciplinare di produzione.

La grande opportunità fornita dall'analisi metabolomica consiste nel poter tracciare il formaggio sia dal punto di vista geografico (legame con il territorio), sia produttivo (tecnologia di produzione) che alimentare (uso di specifici foraggi e mangimi ammessi). L'alimento somministrato alle bovine contiene infatti alcuni "markers" che si mantengono più o meno inalterati nel latte e durante la caseificazione e lo stesso vale per alcuni metaboliti che si formano nel corso della stagionatura, consentendo così di correlare questi ultimi all'alimentazione degli animali, appurando anche la genuinità e la correttezza del processo produttivo.

Piccoli metaboliti dal grande significato

Nello specifico dell'esperimento, il Con-

TECNICA

Tab. 1 - Elenco di alcuni metaboliti di natura lipidica isolati da forme di Grana Padano Dop e da forme contraffatte/imitazioni

Classificazione	Composto (metabolita)	VIP		DOP verso non-DOP	
		Punteggio	Errore standard	Log-Fold Change	Regulation
Acidi grassi e coniugati	C23:1n-7	1.71	0.13	-6.49	Down
	Acido 8-metil-ottadecanoico	1.71	0.14	-8.80	Down
	Acido arthonioico	1.70	0.20	12.54	Up
	Acido 3-metil-2E-esenoico	1.70	0.17	-7.79	Down
	C21: 1N-9	1.66	0.18	-4.31	Down
	Acido esadecanoico, 4-metil-, (R) -	1.66	0.14	-7.22	Down
	Acido 12-ammino-dodecanoico	1.65	0.26	11.16	Up
	Acido 3-idrossi-tridecanoico	1.63	0.15	15.10	Up
	Acido 2-ammino-esadecanoico	1.63	0.20	10.51	Up
Alcoli grassi	15Z-Eicosen-1-olo	1.71	0.13	-4.99	Down
Aldeidi grasse	11Z-Eicosenal	1.71	0.11	-5.50	Down
	3Z-nonenale	1.71	0.11	-7.26	Down
	5Z-Tetradecenal	1.71	0.15	-3.79	Down
	2,4,6,8,10-dodecapentaenal	1.71	0.13	-5.54	Down
	Heptadecanal	1.71	0.13	-3.84	Down
	12Z-esadecenale	1.66	0.18	-4.71	Down
	7Z-dodecenale	1.65	0.26	-5.24	Down
	9Z-Nonadecenal	1.63	0.14	-3.26	Down
	pentanale	1.63	0.10	-10.54	Down
	3Z, 13Z-Octadecadienal	1.65	0.12	-4.51	Down
Amidi grassi	Acido N-stearoil glutammico	1.71	0.13	31.64	Up
	N-oleoil GABA	1.70	0.13	30.54	Up

da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018. Metaboliti classificati secondo un indice VIP (Variables of Importance in Projection) che ne indica l'importanza in quanto variabile utilizzata per discriminare l'autenticità del campione. Il valore Log-Fold Change è un altro indice che aiuta a stabilire di quanto si discostano i due campioni di formaggio (DOP e non-DOP), in base alla presenza del metabolita analizzato. Un valore positivo ed elevato indica che tale metabolita è altamente rappresentato (Up regulation) nel Grana Padano DOP, mentre è scarsamente presente nella sua imitazione.

sorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano Dop ha fornito all'Università 10 forme stagionate 16 mesi che sono state messe a confronto con campioni di formaggi "similari" acquistate sui banchi della grande distribuzione (nazionale od estera), etichettate come "tipo grana", e

provenienti da diverse regioni europee, perciò prodotti fuori dalla specifica area Dop.

La tecnica di preparazione di campioni per l'analisi metabolomica è stata la prima problematica da risolvere, a cui è seguita l'analisi di spettrometria di massa

ad alta risoluzione, e l'analisi dei risultati tramite un approccio statistico in grado di estrapolare in modo specifico la presenza di determinate molecole rappresentanti la traccia distintiva del prodotto autentico Dop.

Questo approccio statistico che segue la

COME SI TUTELA IL GRANA PADANO DOP

Attualmente il Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano mette già in atto diverse misure per garantire l'autenticità del prodotto e scoraggiare gli illeciti.

Le attività del Consorzio comprendono la vigilanza su "abusi, atti di concorrenza sleale, contraffazioni, uso improprio della denominazione o altri comportamenti illeciti nella produzione, trasformazione e commercializzazione del Grana Padano Dop", il ricorso a verifiche analitiche circa la composizione aminoacidica e isotopica specifica del formaggio Grana Padano Dop.

Il Grana Padano è riconosciuto dal 1996 come

un Prodotto di Origine Protetta ed è tutelato da un Disciplinare di produzione.

Il Consorzio attua controlli specifici su ogni forma di Grana Padano per verificare che rispetti gli standard previsti, in collaborazione attualmente con il Csqa.

Le attività di vigilanza e verifica vengono attuate attraverso tutta la filiera: produttori, stagionatori, grattugiatori, confezionatori e punti vendita.

Le verifiche vengono anche effettuate a sorpresa, con eventuale intervento dell'Ufficio Repressione Frodi e dei Nuclei Antisofisticazione.

(Dal sito ufficiale del Consorzio di tutela: www.granapadano.it).

Tab. 2 - Altri metaboliti di natura lipidica isolati da forme di Grana Padano Dop e da forme contraffatte/imitazioni

Classificazione	Composto (metabolita)	VIP		DOP verso non-DOP	
		Punteggio	Errore standard	Log-Fold Change	Regulation
Amidi grassi	Acido N-stearoil glutammico	1.71	0.13	31.64	Up
	N-oleoile GABA	1.70	0.13	30.54	Up
	N-palmitoil valina	1.69	0.12	-5.09	Down
Esteri grassi	Octadecil acetato	1.71	0.13	-5.90	Down
	Eicosil acetato	1.68	0.21	-3.96	Down
	Tridecil acetato	1.64	0.25	-5.20	Down
Esteri metilici di acidi grassi	12-trans-Idrossi giovanile ormone III	1.66	0.30	-2.70	Down
Secosteroids	Ecalcidene	1.67	0.14	30.55	Up
Coniugati steroidi	Kurilensoside F	1.71	0.11	-3.73	Down
	Acido 3alfa-idrossi-11,12-diosso-5beta-colan-24-oico	1.62	0.21	-2.81	Down
	3-acido sulfodesossicolico	1.62	0.29	-2.47	Down
Glicosfingolipidi acidi	C22 solfatide	1.71	0.14	-4.85	Down
Furan acido grasso F6	12,15-epossi-13,14-dimetilicoso-12,14-acido dienoico	1.70	0.16	7.96	Up
Isoprenoidi	Acido omofitanico	1.72	0.13	-10.88	Down
Monoacylgliceridi	MG (20: 1 (11Z) / 0: 0/0: 0)	1.71	0.18	-5.63	Down
Octadecanoidi	Acido 9,13-diidrossi-11-ottadecenoico	1.69	0.13	10.97	Up
	(9S, 13S) -10,11-diidro-12-oxo-15-fitoenoico	1.66	0.13	11.68	Up
	(1S, 2S) -3-oxo-2-pentil-ciclopentaneanoico acido	1.60	0.27	5.26	Up
Fosfolipidi	Acido arachidonico-biotina	1.71	0.15	-2.10	Down
Basi Sfingoidi	Penazetidina A	1.71	0.13	33.77	Up
	N, N-dimetil-Safingol	1.71	0.11	31.95	Up

da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018. Metaboliti classificati secondo un indice VIP (Variables of Importance in Projection) che ne indica l'importanza in quanto variabile utilizzata per discriminare l'autenticità del campione. Il valore Log-Fold Change è un altro indice che aiuta a stabilire di quanto si discostano i due campioni di formaggio (DOP e non-DOP), in base alla presenza del metabolita analizzato. Un valore positivo ed elevato indica che tale metabolita è altamente rappresentato (Up regulation) nel Grana Padano DOP, mentre è scarsamente presente nella sua imitazione.

fase di analisi "chimica vera e propria" è il fattore fondamentale per poter discriminare, nella grande massa di migliaia di dati ottenuti per ogni campione, le differenze significative tra i vari pool di molecole e poter così creare una potenziale carta d'identità metabolomica del prodotto in esame.

I marchi dell'originalità

Gabriele Rocchetti e i suoi colleghi dell'Università Cattolica riferiscono che sono stati individuati ben 775 composti, costituiti soprattutto da lipidi e loro derivati, peptidi ed aminoacidi.

Sono stati individuati due gruppi principali di composti isolati dalle forme di Grana Padano Dop e da quelle etichettate come "tipo grana padano", più un gruppo minore isolato dalle forme a imitazione dell'originale senza richiami espliciti in etichetta (Figura 1).

Una scoperta interessante è emersa da tale classificazione: nei campioni del Grana Padano Dop erano presenti due sottogruppi di composti che risultavano to-

talmente assenti nelle forme non originali. È stato ipotizzato che proprio tale insieme di sostanze possa includere i metaboliti caratteristici del vero formaggio a marchio Dop.

Le analisi evidenziano che il modello predittivo elaborato dal team di ricercatori italiani è in grado di individuare in modo efficace i metaboliti a basso peso molecolare e di classificare come autentici o meno i campioni in maniera affidabile (Figura 2).

I Vip non ingannano

I metaboliti più significativi, denominati Vip markers, sono stati esaminati per tracciare meglio l'origine del campione.

Tra gli 82 composti che sono stati scelti come elemento discriminante del prodotto Dop la maggior parte (51%) appartiene alla classe dei lipidi. Tale scoperta ha un significato importante, perché i ricercatori hanno notato che nelle forme del "tipo grana" la quantità di lipidi è molto più bassa rispetto all'originale (tabelle 1 e 2). È stato perciò ipotizzato che i pro-

cessi di contraffazione possano alterare in modo significativo il profilo lipidico del prodotto finale.

Viene portato come esempio un aspetto del processo produttivo tipico del Grana Padano Dop: il Disciplinare prevede infatti l'utilizzo il latte crudo parzialmente decaffeinato mediante affioramento naturale proveniente da vacche munte massimo due volte al giorno.

Ogni minima variazione da tale processo iniziale può influire sulle caratteristiche e sulla composizione della frazione lipidica, alterando da subito il metaboloma caratteristico del vero Grana Padano Dop.

Anche nel corso della caseificazione e della stagionatura avvengono processi di lipolisi che portano alla formazione di un'impronta chimica utilizzabile per autenticare la forma.

La ricetta del tempo e dei batteri

I ricercatori dei dipartimenti Diana e Distas dell'Università Cattolica spiegano che durante la stagionatura nel Grana

TECNICA

Tab. 3 - Elenco di alcuni metaboliti di natura amminoacidica e altra origine isolati da forme di Grana Padano Dop e da forme contraffatte/imitazioni

Classificazione	Composto (metabolita)	VIP		DOP verso non-DOP	
		Punteggio	Errore standard	Log-Fold Change	Regulation
AMMINOACIDI/PEPTIDI					
Amidi amminoacidici	A 80987	1.68	0.18	32.38	Up
	BILA 2185BS	1.66	0.17	30.19	Up
Aminoacidi	Homometionina	1.69	0.18	32.04	Up
	DL-tirosina	1.68	0.22	33.37	Up
	Metionina	1.64	0.19	38.18	Up
Peptidi	Gln Gln Pro	1.67	0.23	30.64	Up
	Ile Glu	1.65	0.24	20.31	Up
	Val Val	1.64	0.26	33.77	Up
	Lys-Lys-OH	1.63	0.17	32.70	Up

ALTRI COMPOSTI					
Fluorocromi	Rodamina B	1.68	0.24	33.28	Up
Acidi monocarbossilici	Acido faseico	1.67	0.18	13.02	Up
Mono idrossichinoline	4-idrossichinolina	1.69	0.17	33.07	Up
N-acilomoserina Lattoni	N-tetradecanoil-L-omoserina lattone	1.70	0.17	31.36	Up
Acidi organici	5-metil-THF	1.71	0.16	33.18	Up
Piperidine	Magellanina	1.69	0.24	-4.85	Down
Acidi fosfatidici	CPA (18: 2 (9Z, 12Z) / 0: 0)	1.69	0.17	-2.57	Down
Alcoli secondari	1,2-Bis (4-idrossifenil) -2-Propanolo	1.70	0.14	-4.41	Down
Derivati dell'alcol	2-Amino-3-metil-1-butanolo	1.66	0.22	37.32	Up
Composti carbopoliciclici	4,5-Chrysenedicarbossilato	1.67	0.29	-4.37	Down

da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018. Metaboliti classificati secondo un indice VIP (Variables of Importance in Projection) che ne indica l'importanza in quanto variabile utilizzata per discriminare l'autenticità del campione. Il valore Log-Fold Change è un altro indice che aiuta a stabilire di quanto si discostano i due campioni di formaggio (DOP e non-DOP), in base alla presenza del metabolita analizzato. Un valore positivo ed elevato indica che tale metabolita è altamente rappresentato (Up regulation) nel Grana Padano DOP, mentre è scarsamente presente nella sua imitazione.

Tab. 4 - Alcuni metaboliti di origine vegetale isolati da forme di Grana Padano Dop e da forme contraffatte/imitazioni

Classificazione	Composto (metabolita)	VIP		DOP verso non-DOP	
		Punteggio	Errore standard	Log-Fold Change	Regulation
Flavonoidi	2', 6'-dimetossi-3', 4'-methylenedioxydihydrochalcone	1.65	0.22	11.22	Up
	Ternatin C5	1.71	0.15	-5.26	Down
	Okanin 4'- (4''-acetyl-6''-p-cumarumilglucoside)	1.71	0.13	-1.75	Down
	Acacetin 7'- (4''-acetylrutinoside)	1.71	0.17	12.33	Up
	Pelargonidina 3'- (2G-xilosilrutinoside)	1.68	0.21	-3.13	Down
Altri fenoli	Acido 2-idrossi-3- (4-idrossifenil) propenoico	1.68	0.13	12.38	Up
	Sinapilaldeide	1.60	0.33	12.92	Up
Stilbeni	4'-Prenyloxyresveratrol	1.691	0.18	11.59	Up
Alchilfenoli	4-Heptyloxyphenol	1.70	0.20	10.97	Up
Ormoni	Acido diidrojasmonico, estere metilico	1.73	0.17	10.46	Up
	Gibberellin A15	1.71	0.15	11.40	Up
	Strigolactone ABC-rings	1.69	0.18	10.96	Up
Metaboliti	(6S) -dehidrovomifoliol	1.69	0.22	11.69	Up
	Camptotecina	1.69	0.19	-4.17	Down
	Coniferin	1.69	0.17	11.92	Up
	γ-glutamyl-β-cyanoalanine	1.65	0.11	-0.41	Down
Alcaloidi	4'-Desmethylpapaverine glucuronide	1.71	0.16	-2.73	Down
	Serratanidine	1.71	0.14	10.66	Up

da: G. Rocchetti e colleghi, "Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses", pubblicato su Food Research International, volume 113, novembre 2018. Metaboliti classificati secondo un indice VIP (Variables of Importance in Projection) che ne indica l'importanza in quanto variabile utilizzata per discriminare l'autenticità del campione. Il valore Log-Fold Change è un altro indice che aiuta a stabilire di quanto si discostano i due campioni di formaggio (DOP e non-DOP), in base alla presenza del metabolita analizzato. Un valore positivo ed elevato indica che tale metabolita è altamente rappresentato (Up regulation) nel Grana Padano DOP, mentre è scarsamente presente nella sua imitazione.

TECNICA

Padano Dop si verifica un incremento di composti aminoacidici, generati dai processi proteolitici e che conferiscono peculiari caratteristiche qualitative al formaggio (**tabella 3**).

L'assenza di aminoacidi e peptidi appartenenti al gruppo dei markers Vip indica che la stagionatura non è avvenuta secondo quanto previsto dal Disciplinare.

Vi sono molti elementi coinvolti nella formazione dei profili lipidici e proteici tipici del Grana Padano Dop ed i batteri ne sono i maggiori responsabili.

I batteri lattici, ad esempio, sono coinvolti nel metabolismo di lattato e citrato, nel rilascio e trasformazione di acidi grassi liberi e nel catabolismo degli aminoacidi. Nel Grana Padano Dop si crea così un insieme di peptidi peculiari, dei quali è stata effettuata una mappatura proposta come ulteriore marker per l'autenticità del prodotto.

Durante la stagionatura i processi di pro-

teolisi operati grazie agli enzimi producono serina, alanina, metionina e fenilalanina, mentre glutammato, leucina e valina tendono a diminuire. La metionina sembra un marker affidabile della stagionatura del Grana Padano Dop, poiché la sua concentrazione tende ad aumentare nel corso del tempo.

Dal formaggio all'alimentazione

Un altro elemento interessante emerso dalle analisi sperimentali del gruppo di ricerca dell'Università Cattolica è il potenziale legame tra i metaboliti del Grana Padano Dop e l'alimentazione della bovina.

I batteri lattici e la dieta seguita dalla bovina, infatti, influiscono sulle caratteristiche organolettiche del formaggio, grazie alla presenza di aminoacidi liberi e derivati di acidi grassi che conferiscono sapore ed aroma al prodotto finito.

Il metaboloma caratteristico di ciascuna forma potrebbe essere infatti correlato al tipo di alimento che concorre a crea-

re il latte, potendo tracciare in laboratorio un percorso inverso fino al foraggio o al mangime di cui si è nutrita la bovina. In questo caso, ulteriori studi estesi ad una popolazione di campioni più ampia potrebbero confermare la potenzialità dell'approccio. La spettrometria di massa ad alta risoluzione essendo dotata di elevata sensibilità, può infatti individuare markers specifici di composti organici vegetali che hanno subito una metabolizzazione *in vivo* nella bovina e successivamente durante la lavorazione del latte e la stagionatura (**tabella 4**).

I docenti e ricercatori della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università Cattolica del Sacro Cuore concludono sottolineando le potenzialità dell'analisi metabolomica, che andrà certamente approfondita e raffinata e che si presenta già negli studi preliminari come un test affidabile da raccomandare al Consorzio di tutela per smascherare le false forme di Grana Padano Dop immesse sul mercato. ●