Ricerca finanziata dal Ministero della Salute
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria,
la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Caratterizzazione dell'origine geografica della mozzarella di bufala mediante spettroscopia NMR (dal progetto IZS AM 0409)

Salvatore Milone – Reparto Bromatologia e Residui

PREMESSA

Nel settore alimentare suscita grande interesse la possibilità di stabilire se un determinato prodotto alimentare possiede realmente le caratteristiche di qualità per cui il consumatore lo sceglie preferendolo ad un altro prodotto simile.
Questo è importante sia per la salvaguardia dei consumatori che dei produttori da frodi, adulterazioni …ecc.

Le caratteristiche di qualità di un prodotto possono essere diverse a seconda della richiesta specifica del consumatore ed alcuni esempi possono essere:
Provenienza geografica
Sistema di produzione
Specie animale o vegetale da cui è ottenuto
Tracciabilità
Possesso di certificazioni (DOP, IGP, TSG)
Ecc…

IL QUESITO

E’ possibile ottenere la “**impronta digitale**” di un prodotto alimentare e poterlo quindi differerenziare da un altro?

LA BIBLIOGRAFIA

Per tentare di rispondere a questo quesito, studiosi di tutto il mondo stanno valutando le prestazioni di diverse tecniche analitiche già utilizzate con successo in altri campi della ricerca.

In questo nuovo ambito sempre più impegno viene profuso e proliferano lavori scientifici ma data la complessità dell'argomento, la moltitudine e varietà dei prodotti alimentari e delle tecniche analitiche prese in considerazione, resta da compiere molta strada per trovare soluzioni opportune alle varie problematiche.

LA SFIDA

Obiettivo: messa a punto di metodi di analisi basati sulla spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) per **avviare lo sviluppo di un modello** per la caratterizzazione della **mozzarella di bufala** in grado in futuro di verificare la provenienza di campioni incogniti.

MOZZARELLA DI BUFALA

La mozzarella di bufala è un prodotto di derivazione del latte tipicamente italiano, le cui caratteristiche organolettiche sono legate alla provenienza, alla qualità delle materie prime e alle tecniche produttive utilizzate.

In particolare, la "Mozzarella di Bufala Campana", prodotto molto apprezzato dai consumatori, è ottenuta esclusivamente da latte di bufala prodotto in definite aree del Sud Italia.

Il Regolamento (CE) N. 1107/96 ha attribuito alla "Mozzarella di Bufala Campana" il **marchio DOP.** Il disciplinare di produzione definisce le zone di provenienza e trasformazione del latte e le modalità di lavorazione del formaggio.

LA TECNICA NMR

La spettroscopia NMR è basata sull'assorbimento di radiazione nel campo delle radiofrequenze da parte di nuclei "NMR attivi" in presenza di un campo magnetico. Attraverso la spettroscopia NMR si ottengono informazioni sulla struttura molecolare osservando i nuclei atomici.
Diverse tecniche possono essere applicate.

Ad esempio:

- High Resolution Nuclear Magnetic Resonance (HR-NMR) per campioni in soluzione
- High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS) per campioni semisolidi
- Cross Polarisation Magic Angle Spinning (CP-MAS) per campioni solidi
- Risonanza Magnetica per Immagini (MRI) utilizzata, ad esempio, in ambito clinico

I PROGETTI COINVOLTI

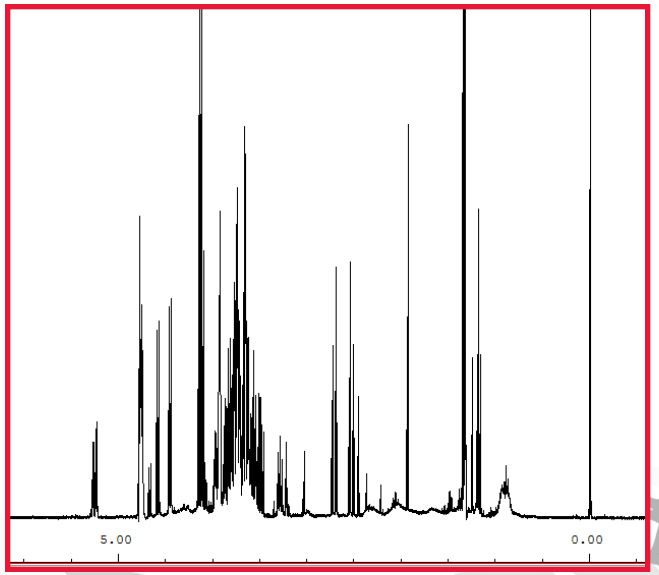
Lo studio effettuato nel nostro centro sulla caratterizzazione dell'origine geografica della **mozzarella di bufala** mediante **spettroscopia NMR** è stato portato avanti grazie a due progetti ministeriali consecutivi che ci hanno permesso di valutare la possibilità di utilizzare la tecnica HR-NMR in combinazione con l'analisi statistica multivariata per la problematica di interesse.

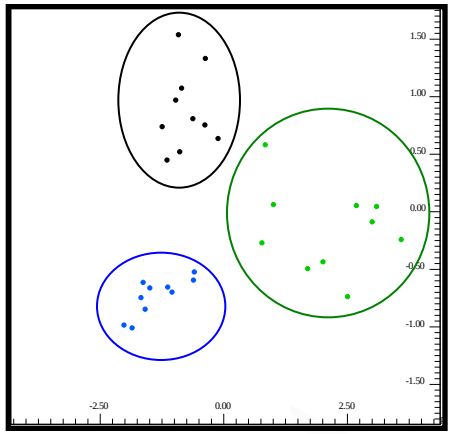
-Il primo Progetto (IZSAM0908RC) si è concluso nel 2011 e lo scorso anno sono stati presentati i primi risultati relativi ad analisi ed elaborazione dei dati ottenuti su 60 campioni provenienti da tre caseifici posti in tre regioni geografiche differenti

-Il secondo Progetto (IZSAM0409RC) che si è concluso nel 2012 ha riguardato un maggior numero di campioni (105) e di caseifici coinvolti. **In questo progetto sono stati rielaborati tutti i dati raccolti in entrambi i progetti.**

NMR

La **Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare** (**NMR**), con l'ausilio dell'analisi statistica multivariata (**chemiometria**) applicata ai dati spettroscopici ottenuti, è una delle tecniche che permette di ottenere la "**impronta digitale**" di un campione.





IL METODO

Sono stati analizzati campioni di mozzarella di bufala prodotti in zone interne ed esterne a quelle definite dal disciplinare della "Mozzarella di Bufala Campana DOP" al fine di individuare caratteristiche del prodotto riconducibili alla zona di provenienza.

Utilizzando la tecnica in soluzione ^{1}H HR-NMR sono stati effettuati esperimenti in cui il nucleo di osservazione è ^{1}H utilizzando la presaturazione per ridurre l'assorbimento dei nuclei ^{1}H dell'acqua.

LE TECNICHE CHEMIOMETRICHE

I dati spettroscopici ottenuti sono stati elaborati utilizzando le seguenti tecniche di analisi statistica multivariata :
Principal Component Analysis (PCA) ***tecnica unsupervised***;
Linear Discriminant Analysis (LDA) ***tecnica supervised***.

✓Nelle tecniche **unsupervised**, non vengono formulate ipotesi a priori sul modo in cui i campioni si raggruppano. Analisi esplorative dei dati.
✓Le tecniche **supervised** si basano sull'ipotesi a priori che esistano dei gruppi all'interno dei campioni analizzati. È possibile utilizzare tali tecniche quando sia nota con certezza, ad esempio, la provenienza dei campioni.

PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

La PCA è una tecnica che opera la trasformazione delle variabili originali presenti nei dati in nuove variabili, non correlate, denominate Componenti Principali (PC).
E' una tecnica per la semplificazione dei dati utilizzata nell'ambito della statistica multivariata.

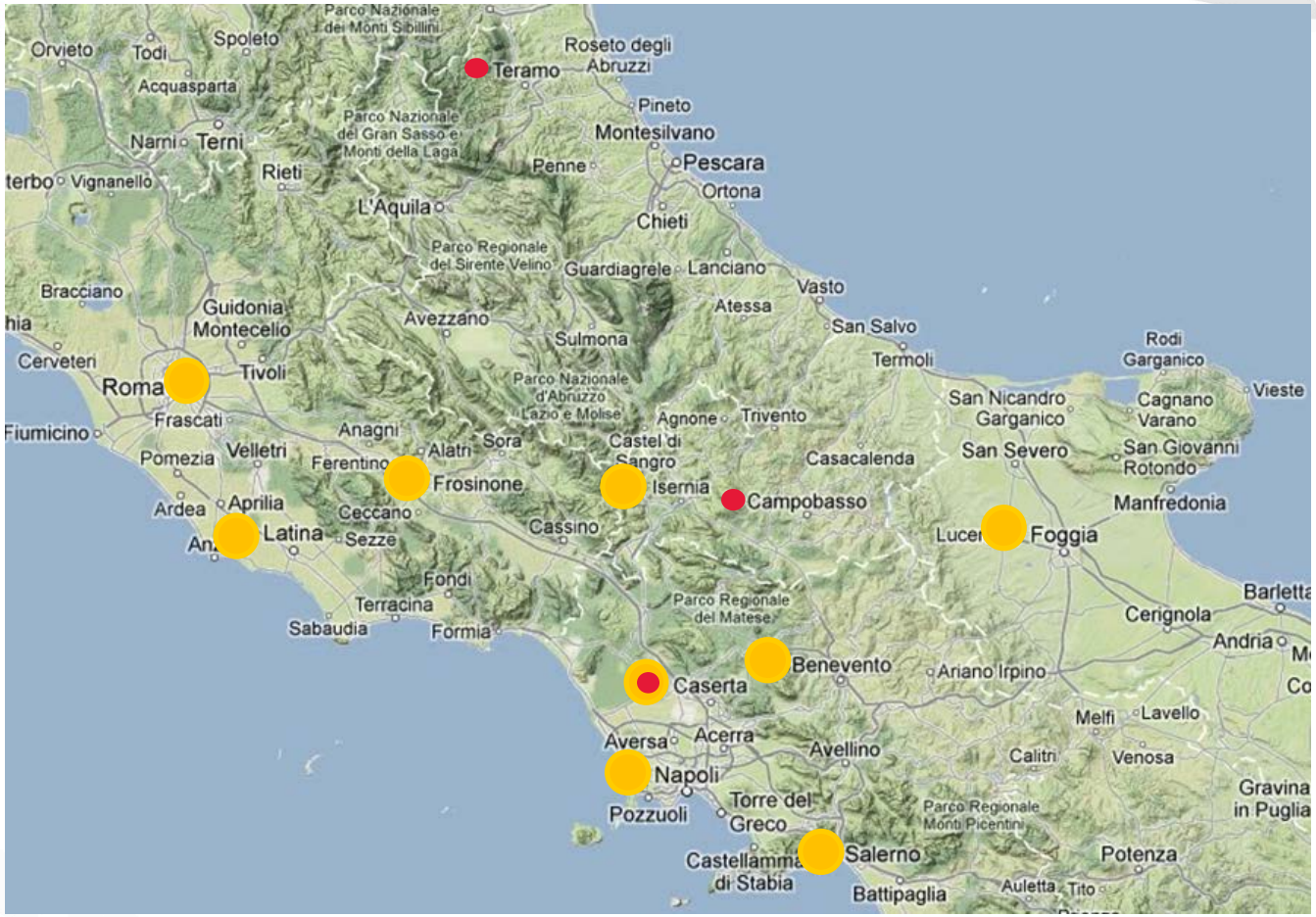
✓Nel nostro caso tramite questa tecnica si è potuto rilevare che 3 dei 165 campioni analizzati si discostavano dal proprio gruppo in quanto outliers.

LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS

La LDA è basata sulla determinazione della funzione discriminante lineare che massimizza la varianza tra le classi e minimizza la varianza interclasse. Nella LDA, si suppone che le classi seguano una distribuzione normale multivariata e che siano linearmente separate.

✓Nel nostro caso con questa tecnica è stato possibile ottenere un modello di classificazione con performance elevata.

IL CAMPIONAMENTO DEI PROGETTI



- *Zone definite nel disciplinare di produzione*
- ***Campionamento effettuato nella zona del Casertano, in provincia di Campobasso e Teramo negli anni 2009-2012.***

IL CAMPIONAMENTO TOTALE

		area geografica Caserta	area geografica Campobasso	area geografica Teramo
Progetto precedente	caseifici	1	1	1
	numero di campioni prelevati	20	20	20
Progetto 1 + 2 Totale	caseifici	7	2	1
	numero di campioni prelevati	116	29	20

IL METODO DI ANALISI

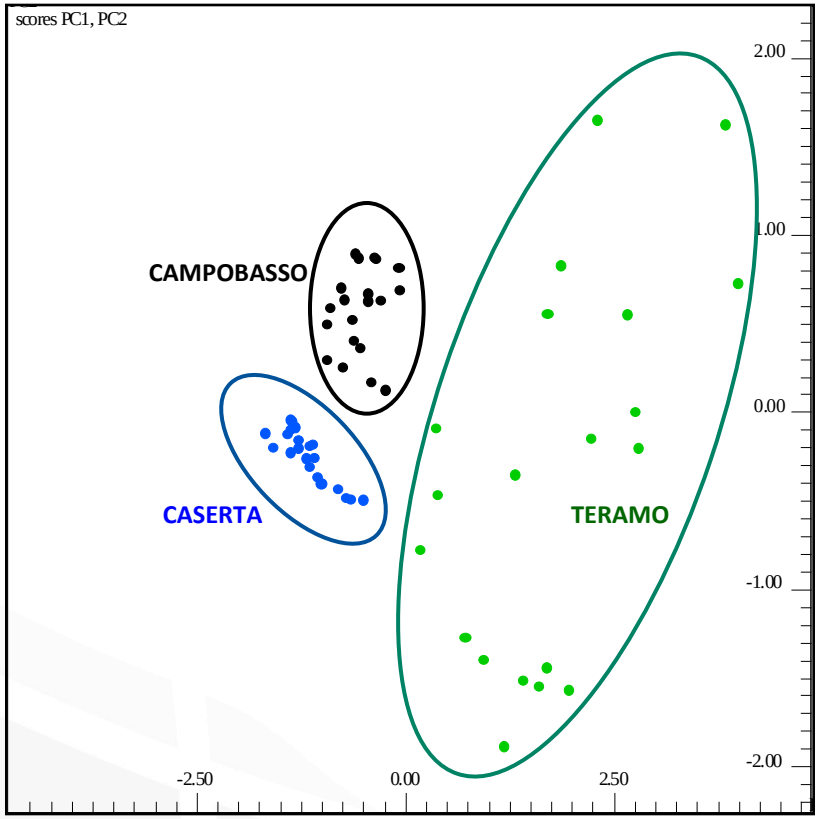
omogeneizzazione

aliquota di omogeneizzato
+
standard interno in D_2O

agitazione

centrifugazione

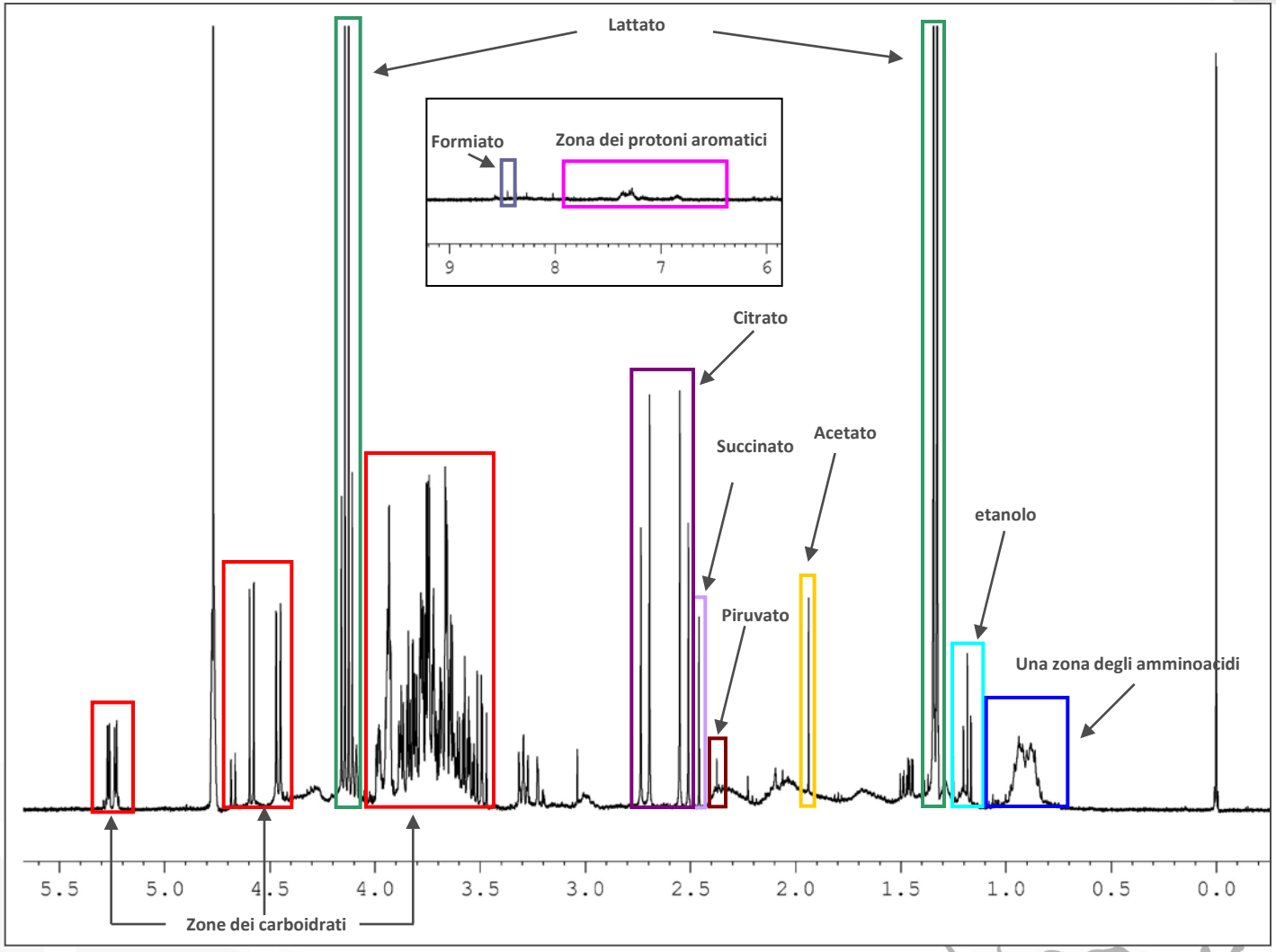
PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS
PCA: scores plot primo progetto



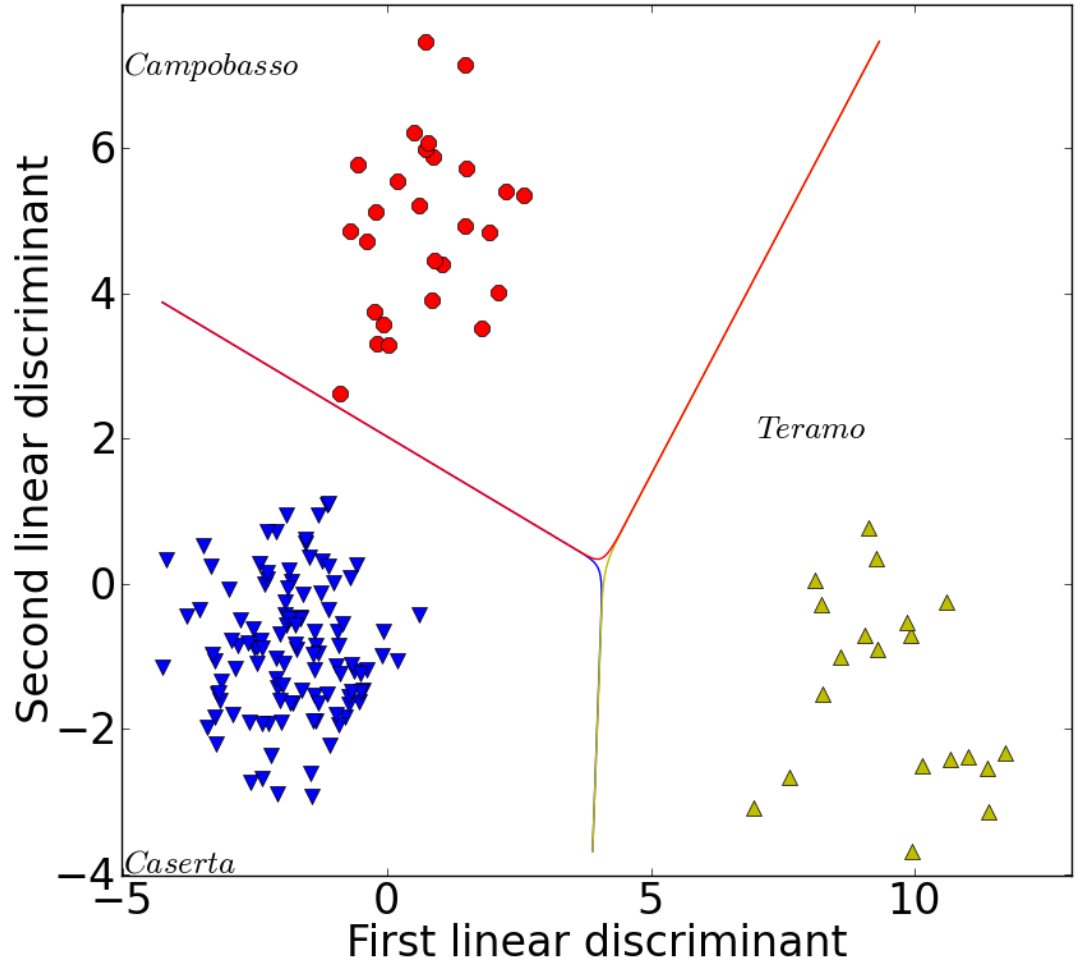
Analisi statistica multi-variata effettuata sui 60 campioni provenienti dalle 3 località.

Si osserva che campioni provenienti da zone geografiche diverse si posizionano in differenti aree dello scores plot.

UNO SPETTRO ^{1}H HR-NMR



LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS
LDA primo e secondo progetto



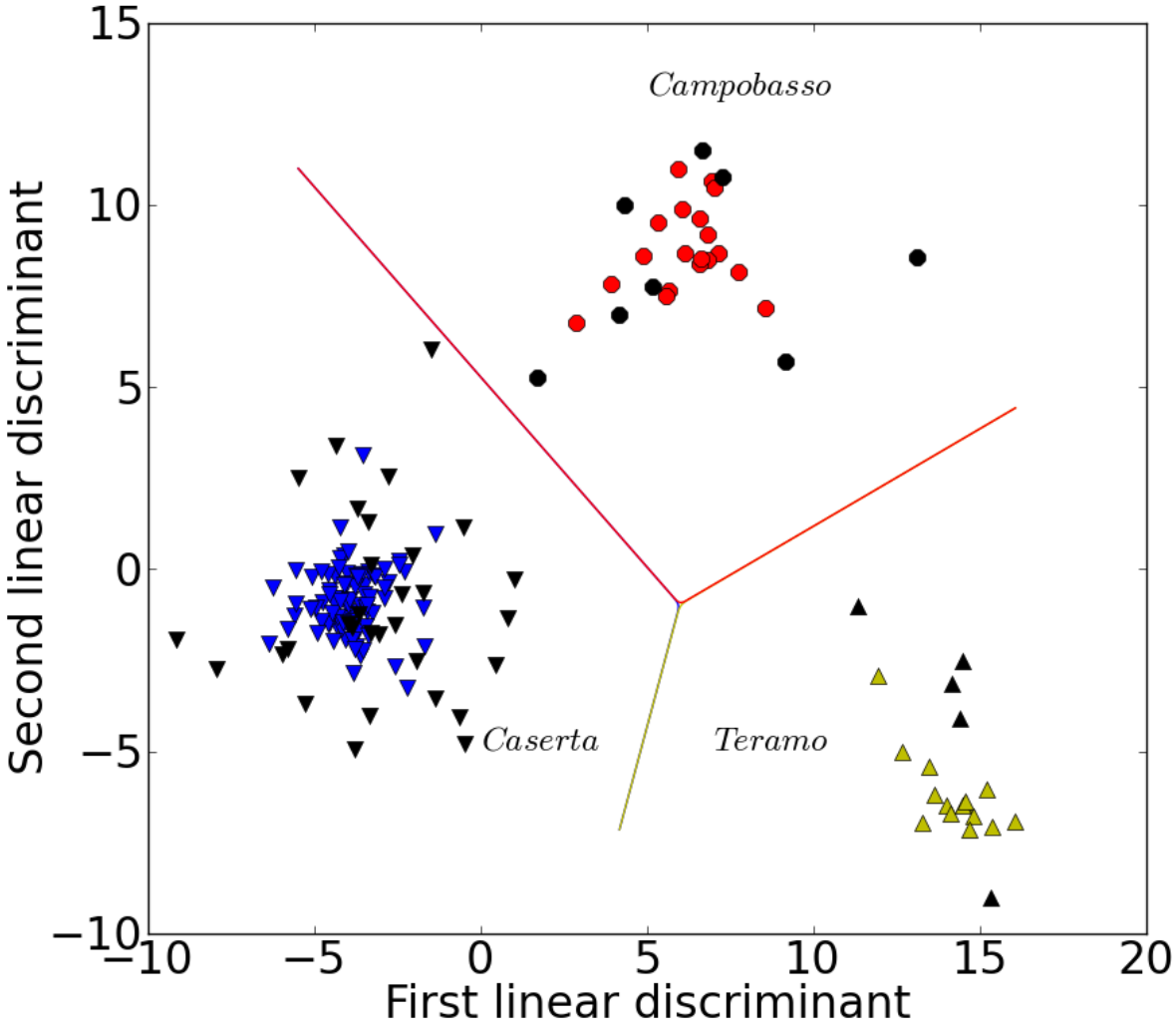
LDA:
Modello di classificazione ottenuto considerando 45 variabili delle 389 totali e 162 campioni totali.

VALIDAZIONE DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE

Le linee, che separano i tre gruppi di mozzarelle in base alla loro provenienza, sono le separation boundaries e rappresentano le zone in cui un campione ha la probabilità del 50% di essere predetto correttamente nella propria classe.

Per poter "visualizzare" le prestazioni del modello ottenuto, è stato utilizzato un processo di validazione in cui 1/3 del numero totale di campioni viene casualmente eliminato dal modello e i rimanenti vengono utilizzati per generare un sub-modello, attraverso il quale i campioni eliminati, e quindi non assegnati a nessuna classe, vengono predetti. I risultati di questo step di validazione interna sono mostrati nella Figura seguente.

VALIDAZIONE INTERNA DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE
LDA primo e secondo progetto



LDA: Processo di validazione dei campioni: tutti i campioni eliminati dal modello vengono assegnati correttamente alle rispettive classi di appartenenza.

Modello di classificazione ottenuto considerando 45 variabili delle 389 totali e 162 campioni.

VALIDAZIONE DEL MODELLO DI CLASSIFICAZIONE CROSS-VALIDATION

Per passare da un modello visivo al calcolo numerico della performance del modello ottenuto si è utilizzata una cross validation interna (K-fold) .

L'approccio consiste nell'assegnare casualmente campioni a un training set e a un test set. Quest'ultimo contiene circa 1/k dei campioni (k-fold = 10 per classe). Tale divisione permette di avere un numero di campioni sufficiente nel training set e rappresentativo nel test set. Tale processo è ripetuto k volte variando così la popolazione delle classi in modo da assicurare che tutti i campioni abbiano la possibilità di essere inclusi nella valutazione del set almeno una volta.

I risultati ottenuti da questo processo di validazione assegnano in media una performance del modello di classificazione pari al **99 ± 1 %**.

Attività effettuate

- ✓ Casefici selezionati per lo studio nelle tre aree geografiche: 10
- ✓ Campioni analizzati: 165
- ✓ Stagionalità: estate (2009), primavera (2010), inverno (2011-2012)
- ✓ Raccolta di informazioni dai produttori
- ✓ Formazione del personale sullo strumento NMR
- ✓ Formazione del personale sulla chemiometria
- ✓ Utilizzo di esperimenti NMR più complessi

Conclusioni

Questo lavoro effettuato con l'utilizzo della tecnica NMR in combinazione con l'analisi statistica multivariata, mostra la possibilità di differenziare i campioni di mozzarella di bufala oggetto di studio in funzione dell' origine geografica.

Elenco dei collaboratori al progetto

Progetto IZS AM 0409

Dr. Giampiero Scortichini, Responsabile Scientifico del Progetto

Dr.ssa Alessandra Micozzi, Chimico
Dr.ssa Arianna Stramenga, Chimico
Dr. Salvatore Milone, Chimico

Ringraziamenti

Si ringraziano:

Il personale Bruker BioSpin

Il Dr. Lamanna (ENEA-TRISAIA)

Grazie per l’attenzione

Per contatti:

g.scortichini@izs.it

a.micozzi@izs.it

s.milone@izs.it