

UTILIZZO A SCOPO ANALITICO DEGLI ISOTOPI STABILI DI CARBONIO, AZOTO, OSSIGENO E IDROGENO PER LA DESCRIZIONE DELL'AUTENTICITÀ DI PRODOTTO

ANALYTICAL EMPLOYMENT OF STABLE ISOTOPES OF CARBON, NITROGEN, OXYGEN AND HYDROGEN FOR FOOD AUTHENTICATION

Novelli E.¹, Balzan S.¹, Perini M.², Antonetti P.³, Fasolato L.¹, Camin F.²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova

²Fondazione Edmund Mach San Michele all'Adige (TN)

³ULSS n. 12 Veneziana, Venezia

SUMMARY

Stable isotopes of carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen were used for analytical purposes for the discrimination of the type of production (farming vs. fishing) in the case of sea bass and for geographical origin in the case of milk. These results corroborate similar experimental evidences and confirm the potential of this analytical tool to support of food traceability.

KEYWORDS

Stable isotope, seabass, milk, production method, geographical origin

INTRODUZIONE

L'obiettivo dello studio consiste nella valutazione preliminare di uno strumento analitico (analisi quantitativa degli isotopi stabili) ai fini della discriminazione della tipologia produttiva della spigola (allevamento vs pesca) e dell'origine geografica del latte. Tali obiettivi hanno un'importante ricaduta legale giacché l'etichettatura dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura fa propri gli obblighi di rintracciabilità di prodotto (1) e altrettanto rilevante risulta l'impegno di tutela del consumatore nel caso dei prodotti lattiero-caseari a marchio, dove l'origine del latte è stabilita da apposito disciplinare.

In tale ambito le frodi sono tutt'altro che rare dettate per lo più da motivi economici e di contingenza stagionale. In Veneto la produzione agricola primaria e di trasformazione rappresenta un'importante voce economica che annovera fra i prodotti caseari diverse tipologie a marchio.

Nel caso del latte, i peculiari meccanismi biochimici e fisiologici della lattifera fanno sì che una quota significativa dei solidi idrosolubili ingeriti con la dieta (mangime, foraggio, insilati,

acqua, ecc.) venga poi secreto nel latte. Particolarmente significativo è il contributo dell'acqua di bevanda soprattutto per ²H e ¹⁸O la cui abbondanza nell'ambiente segue precise regole conformi con la latitudine, l'altitudine, la distanza dal mare.

Analogamente l'abbondanza dell'isotopo ¹³C in alcune fonti vegetali (mais e canna da zucchero) risulta significativa per la discriminazione della tipologia produttiva nel caso dei prodotti della pesca. L'analisi dei rapporti tra isotopi stabili (H, C, N, O, S) mediante Spettrometria di Massa Isotopica (IRMS) ha dimostrato la potenzialità di differenziare prodotti animali quali carne, latte, burro e formaggio di diversa origine geografica (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) e di diversa tipologia produttiva nel caso della spigola (10).

Tale discriminazione fa leva sul fatto che i rapporti isotopici nei prodotti di origine animale sono correlati alla composizione della dieta (impiego del mais) e posizione geografica delle risorse alimentari compresa l'acqua di bevanda.

MATERIALI E METODI

Campioni

Prodotti della pesca

Le spigole analizzate a titolo di standard per il prodotto selvaggio sono state prelevate presso i mercati ittici all'ingrosso di Venezia e Milano (n=19) laddove la provenienza geografica corrispondeva alle zone FAO 37.1 (Mar Mediterraneo) e 27 (Oceano Atlantico Nord orientale). Lo standard per il prodotto allevato (n=20) era in parte locale (raccolto presso 3 allevamenti del Nord-est) e in parte estero (Grecia).

Il prodotto commerciale (n=67) è stato acquistato presso esercizi della grande distribuzione e pescherie. I campioni erano in numero pari a 34, per il prodotto d'allevamento, 33 per il prodotto di pesca.

Latte

I campioni di latte intero sono stati prelevati direttamente presso la stalla. Per il prodotto locale (Provincia di Venezia) si trattava di n. 7 stalle (n=7) mentre il prodotto cosiddetto estero proveniva dalla Baviera (n=2), Francia zona Lione (n=2), Austria per lo più area Tirolo (n=5) e n.1 campione anche da una stalla del sud-Tirolo.

In totale sono stati analizzati n. 17 campioni. Dopo il prelievo i campioni sono stati congelati fino al momento dell'analisi in laboratorio.

Analisi degli isotopi

Prodotti della pesca

Il campione è stato prima ridotto in filetto, quindi macinato (4000 rpm x 5s, Retsch Düsseldorf, Germany), liofilizzato e macinato ancora una volta (4000 rpm x 5s, Retsch Düsseldorf, D) per ottenere una polvere sottile molto omogenea.

Un'aliquota di liofilizzato è stata sgrassata a freddo (11) e sul residuo proteico (circa 0,5 mg) si è proceduto prima con la sua combustione mediante un analizzatore elementare (EA Flash 1112 ThermoFinnigan, Bremen, Germany) cui ha fatto seguito l'analisi degli isotopi stabili $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mediante spettrometro di massa isotopica (Delta plus XP ThermoFinnigan, Bremen, Germany) come già descritto dagli autori in dettaglio (4).

I valori misurati sono stati espressi ‰ (4) verso lo standard internazionale (Vienna-Pee Dee Belemnite per $\delta^{13}\text{C}$, Aria per $\delta^{15}\text{N}$). L'incertezza (2 σ) era pari a $\pm 0.2\%$ per entrambi gli isotopi.

Latte

Nel caso del latte il rapporto $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ è stato determinato direttamente nel latte in seguito ad equilibratura della frazione acquosa del latte con CO_2 a titolo noto ($\text{C}^{16}\text{O}_2 + \text{H}_2^{18}\text{O} = \text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O} + \text{H}_2^{16}\text{O}$). Per la misura è stato utilizzato uno

spettrometro di massa isotopica (Sira II - VG ISOGAS, Fisons, Rodano, Milano) interfacciato con un equilibratore per la CO_2 (Isoprep 18, VG-Fisons) utilizzando la modalità operativa *dual inlet* come riportato nel dettaglio nel Reg CE 822/97 (12) e nel metodo ENV 12141 (13). Gli altri rapporti isotopici sono stati determinati nella caseina estratta dal latte scremato ed acidificato a pH 4.3 con HCl 2N.

I rapporti isotopici $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e il rapporto isotopico $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ sono stati misurati con uno spettrometro di massa isotopica (Delta V, Thermo Finnigan, Brema, Germania) in seguito a combustione del campione (EA Flash 1112, Thermo Finnigan, Brema, Germania), mentre i rapporti $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ sono stati analizzati simultaneamente in seguito a pirolisi (Spettrometro Delta xp, Thermo Finnigan, interfacciato ad un pirolizzatore, TC-EA, Thermo Finnigan). Le condizioni operative per l'analisi dei rapporti $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ sono riportate in precedenti pubblicazioni (4), mentre per l'analisi di $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ si sono seguite le indicazioni di Fry (2007) (9).

I dati ottenuti sono stati espressi in ‰ rispetto agli standard internazionali Vienna-Pee Dee Belemnite (V-PDB) per $\delta^{13}\text{C}$, Aria (AIR) per $\delta^{15}\text{N}$, Vienna - Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) per $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, Vienna - Canyon Diablo Triolite (V-CDT) per $\delta^{34}\text{S}$ secondo la formula:

$$\delta\text{‰} = \frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \cdot 1000$$

dove R corrisponde al rapporto tra l'isotopo pesante e leggero. L'incertezza estesa (2 volte la deviazione standard di riproducibilità intralaboratorio) associata al metodo è pari a 0.3‰ per $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua del latte, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ della caseina, 0.8‰ per $\delta^{18}\text{O}$ della caseina, 1‰ per $\delta^{34}\text{S}$ e 3‰ per $\delta^2\text{H}$.

Elaborazione dei risultati

I valori misurati sono stati mediati e sottoposti ad analisi della varianza. Si è inoltre proceduto con l'analisi multivariata per componenti principali mediante pacchetto SPSS 17.0 (SPSS Chicago, IL).

RISULTATI

I valori di abbondanza relativa dei due isotopi dei campioni di spigola analizzati a titolo di standard sono presentati in Tabella 1. Per entrambi si sono osservate abbondanze significativamente superiori nel prodotto pescato rispetto quello d'allevamento.

Per i campioni prelevati direttamente in commercio i valori di abbondanza degli isotopi misurati sono riportati in Tabella 2 e 3 raggruppa-

ti secondo le informazioni riportate in etichetta e dopo analisi multivariata rispettivamente. Nel primo caso le differenze delle medie sia per il carbonio che per l'azoto sebbene significative erano comunque modeste. Nel secondo caso le differenze erano altamente significative ($P < 0,001$).

Il risultato dell'analisi per componenti principali è riportato nelle Figure 1 e 2 in riferimento allo standard e al campione commerciale rispettivamente. Si è osservata un'efficiente capacità di dividere lo standard in due gruppi (allevamento vs pesca) anche con il contributo di due sole variabili (Fig. 1).

Il campione commerciale, virtualmente rappresentato da soggetti pescati e allevati con numerosità pressoché identica, all'analisi multivariata ha evidenziato proporzioni decisamente differenti. A fronte di soli n. 10 soggetti ascrivibili a prodotto pescato ve ne sono n. 57 di allevamento (Fig. 2).

L'analisi isotopica del latte ha evidenziato i valori medi di abbondanza riportati in Tabella 4. Gli isotopi del carbonio, azoto, ossigeno nella frazione acquosa e idrogeno sono risultati essere quelli più significativi al fine della discriminazione geografica della zona di produzione. In particolare $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$ e $\delta^2\text{H}$ sono risultati più abbondanti nel latte di produzione locale mentre $\delta^{15}\text{N}$ era più rappresentato nel prodotto d'oltralpe (sud-Tirolo incluso).

L'elaborazione per componenti principali è riportata in Figura 3. Anche in questo caso l'analisi isotopica si è rivelata estremamente efficace nella separazione del campione locale dal prodotto estero.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'isotopo 13 del carbonio misurato sul campione sgrassato si è rivelato estremamente predittivo nel discriminare la spigola in funzione della tipologia predittiva. A ciò verosimilmente concorrono due effetti. Da un lato la scarsità di fonti alimentari ricche di ^{13}C nel mangime impiegato in acquacoltura (le principali fonti vegetali ricche in ^{13}C sono il mais e la canna da zucchero), dall'altro il processo di biomagnificazione del ^{13}C lungo la catena trofica dell'ambiente marino.

La spigola, pesce predatore, si colloca pertanto nella parte più alta della piramide alimentare. L'impiego ai fini analitici di tessuto sgrassato contribuisce a minimizzare un'importante fonte di variabilità connessa alle fluttuazioni quantitative cui questo tessuto è soggetto.

Anche per l'isotopo dell'azoto sembra sussistere una sorta di aumento nell'abbondanza relativa

del tessuto muscolare passando dalle specie erbivore attraverso le onnivore fino alle carnivore. Tuttavia, in letteratura i riscontri riguardo l'isotopo ^{15}N sono meno univoci rispetto quanto osservato per il ^{13}C .

Per il latte si è voluto invece testare il potere discriminante degli isotopi stabili nei confronti della posizione geografica del luogo di produzione. I valori misurati in termini di abbondanza relativa sono coerenti con quanto riportato in letteratura.

Le coordinate geografiche della Provincia di Venezia (soprattutto in termini di latitudine inferiore rispetto l'ubicazione dei luoghi di campionamento estero), l'altitudine inferiore e la minor distanza dal mare sono gli elementi caratterizzanti la maggior concentrazione di $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}_{\text{acqua}}$ del latte di provenienza locale. Nel latte della Provincia di Venezia insiste comunque anche una maggior abbondanza in termini di $\delta^{13}\text{C}$. Questo rilievo è da attribuire al largo ricorso di mais nel razionamento della vacca da latte come consuetudine zootecnica della pianura Padana laddove nei comprensori d'oltralpe prevale il foraggio come base alimentare soprattutto nel periodo estivo (che notoriamente è un alimento abbastanza povero di ^{13}C). Infine l'isotopo dell'azoto è risultato, in termini di abbondanza, a favore della produzione estera.

Tale riscontro può essere ascritto all'impiego di letame quale fonte azotata per il pascolo. L'isotopo pesante dell'azoto è più rappresentato nelle deiezioni animali di quanto non lo sia in altre tipologie di fertilizzante chimico; il pascolo arricchito con questa fonte naturale di azoto risulta essere a sua volta una fonte importante di ^{15}N per la lattifera. Diversamente, le leguminose dotate di capacità fissatrice dell'azoto atmosferico, che risultano variamente distribuite fra le essenze del pascolo, sono di per sé una fonte di ^{15}N di minor importanza.

In conclusione, gli isotopi stabili di ^{13}C , ^{15}N , ^2H e ^{18}O possono essere un promettente strumento analitico a supporto della tracciabilità degli alimenti, tanto in riferimento alla tipologia produttiva (nel caso della spigola) quanto all'origine geografica nel caso del latte.

Tabella 1. Abbondanza relativa (media) e significatività della differenza (P) degli isotopi del carbonio e dell'azoto nei campioni standard di spigola.

	Allevamento	Pesca	P
N° osservazioni	20	19	
$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰ vs V-PDB}$	-18,06	-14,98	<0,001
$\delta^{15}\text{N} \text{ ‰ vs AIR}$	12,45	14,99	0,001

Tabella 2. Abbondanza relativa (media) e significatività della differenza (P) degli isotopi del carbonio e dell'azoto nei campioni di spigola prelevati presso gli esercizi commerciali. Ripartizione secondo le indicazioni della tipologia produttiva riportate in etichetta.

	Allevamento	Pesca	P
N° osservazioni	34	33	
$\delta^{13}\text{C} \text{‰ vs V-PDB}$	-18,04	-17,51	0,034
$\delta^{15}\text{N} \text{‰ vs AIR}$	11,77	12,84	0,042

Tabella 3. Abbondanza relativa (media) e significatività della differenza (P) degli isotopi del carbonio e dell'azoto nei campioni di spigola prelevati presso gli esercizi commerciali. Ripartizione dopo l'analisi multivariata.

	Allevamento	Pesca	P
N° osservazioni	57	10	
$\delta^{13}\text{C} \text{‰ vs V-PDB}$	-18,11	-15,88	<0,001
$\delta^{15}\text{N} \text{‰ vs AIR}$	11,53	16,66	<0,001

Tabella 4. Abbondanza relativa (media) e significatività della differenza (P) degli isotopi stabili nei campioni di latte raggruppati secondo l'ubicazione geografica del luogo di produzione.

	Provincia di Venezia	Estero	P
N° osservazioni	7	10	
$\delta^{13}\text{C} \text{‰ vs V-PDB}$	-17,79	-22,8	<0,001
$\delta^{15}\text{N} \text{‰ vs AIR}$	5,10	5,83	0,001
$\delta^{18}\text{O} \text{‰ vs V-SMOW}$ (acqua)	-5,7	-7,21	0,006
$\delta^{18}\text{O} \text{‰ vs V-SMOW}$ (caseina)	9,01	9,24	0,717
$\delta^2\text{H} \text{‰ vs V-SMOW}$	-95,46	-111,3	0,001
$\delta^{34}\text{S} \text{‰ vs V-CDT}$	2,56	2,68	0,688

Figura 1. Analisi per componenti principali dei campioni standard di spigola

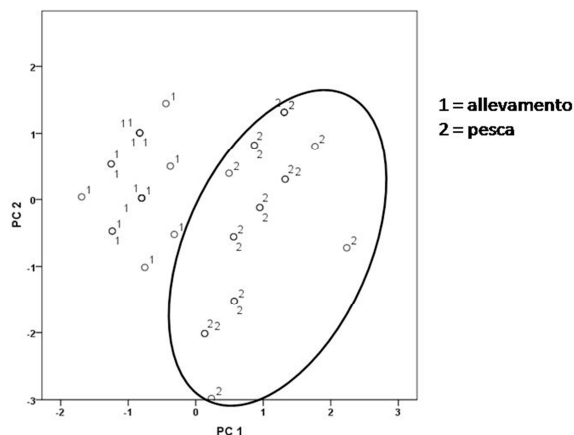


Figura 2. Analisi per componenti principali dei campioni di spigola prelevati presso gli esercizi del commercio.

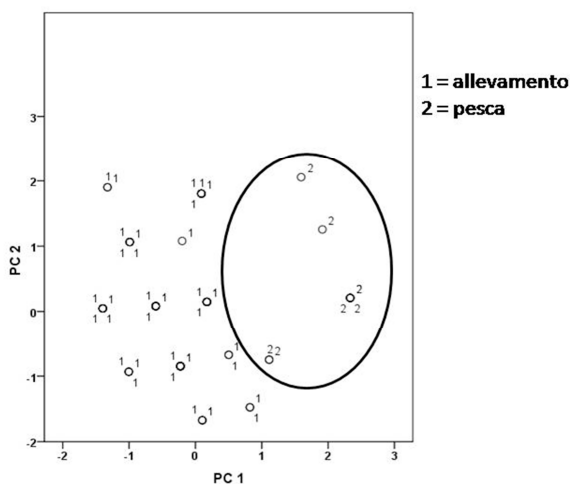
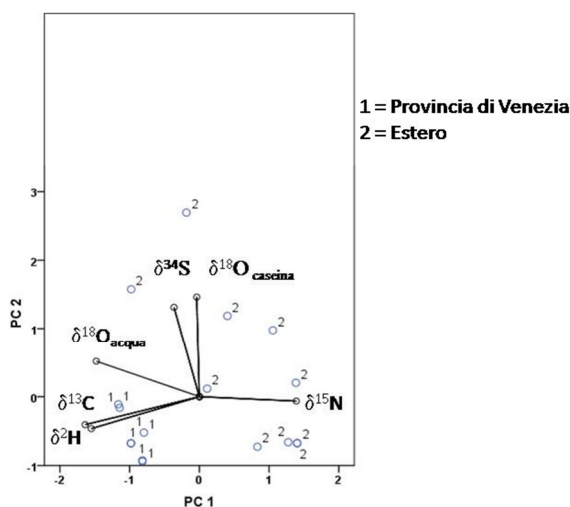


Figura 3. Analisi per componenti principali dei campioni di latte di diversa origine geografica.



BIBLIOGRAFIA

1. Reg CE 2065/01. REGOLAMENTO (CE) N. 2065/2001 DELLA COMMISSIONE del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.
2. Rossmann A., Kornexl B., Versini G., Pichlmayer F., Lamprecht G. (1998). Origin assignment of milk from alpine regions by multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). In Atti del primo convegno internazionale Gli alimenti montani (pp. 37-50). Trento, Istituto agrario di San Michele all'Adige.
3. Rossmann, A.; Haberhauer, G.; Hölzl, S.; Horn, P.; Pichlmayer, F.; Voerkelius, S. (2000). The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research and Technology*, 211, 32-40.
4. Camin F., Wietzerbin K., Blanch Cortes A., Haberhauer G., Lees M., Versini G. (2004). Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6592-6601.
5. Camin F., Bontempo L., Heinrich K., Horacek K., Kelly S.D., Schlicht C., Thomas F., Monahan F., Hoogewerff J., Rossmann A. (2007). Multi-element (H,C,N,S) stable isotope characteristics of lamb meat from different European regions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, (1), 309-320.
6. Manca G., Camin F., Coloru G., Del Caro A., Depentori D., Franco M.A., Versini G. (2001). Characterisation of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1404-1409.
7. Manca G., Franco M.A., Versini G., Camin F., Rossmann A., Tola A. (2006). Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cows' milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 831-839.
8. Piasentier E., Valusso R., Camin F., Versini G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64, 239-247.
9. Perini M, Camin F, Bontempo L, Rossmann A, Piasentier E (2009). Multielement (H, C, N, O, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different Italian regions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, (16), 2573-2585.
10. Fasolato L, Novelli E, Salmaso L, Corain L, Camin F, Perini M, Antonetti P, Balzan S. (2010). Application of Nonparametric Multivariate Analyses to the Authentication of Wild and Farmed European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Results of a Survey on Fish Sampled in the Retail Trade. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, (20), 10979-10988.
11. Folch J., Less M., Stanley G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
12. Reg CE 822/97. Regolamento (CE) n. 822/97 della Commissione del 6 maggio 1997 recante modifica del regolamento (CEE) n. 2676/90 che determina i metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino.
13. Metodo ENV 12141. Metodo per la determinazione dell'acqua aggiunta. Succhi di frutta e di ortaggi. Determinazione del rapporto tra gli isotopi stabili dell'ossigeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) dell'acqua contenuti nei succhi di frutta. Metodo mediante spettrometria di massa per rapporto tra isotopi.