

ANALISI



Tecnologie innovative basate sul DNA per investigare l'autenticità di alimenti e bevande fermentati DOP e IGP

Lo studio condotto dal CNR-ISPA prende in esame le nuove tecnologie per il riconoscimento del DNA dei microrganismi al fine di individuare le tecniche migliori per valutare l'autenticità di alimenti e bevande fermentati DOP e IGP e contrastare così le frodi alimentari

Per fini di lucro, l'etichetta dell'alimento, o il prodotto alimentare stesso, possono essere alterati, o sostituiti, commettendo così una frode alimentare. Per superare questo problema, che causa un danno a consumatori e industria di circa 10-15 miliardi di dollari all'anno (come stimato dalla U.S. Food and Drug Administration), l'autenticazione alimentare, intesa come un processo analitico che accerta le informazioni sull'etichetta relative i) al contenuto, ii) all'origine e iii) al processo di produzione dell'alimento, risulta di fondamentale importanza.

Come definito dal gruppo di esperti dell'International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP), gli alimenti fermentati sono "alimenti prodotti mediante replicazione microbica desiderata e conversioni enzimatiche delle componenti alimentari". Nell'Unione Europea, i marchi sulle Indicazioni Geografiche, noti come "Denominazione di Origine Protetta" (DOP) e "Indicazione Geografica Protetta" (IGP), promuovono e proteggono numerosi prodotti agricoli e alimentari. I prodotti che posseggono lo status DOP o IGP sono contrassegnati con il rispettivo logo che aiuta così i consumatori a poterli riconoscere. In particolare questi marchi proteggono un prodotto che proviene da una regione specifica e segue un particolare processo di produzione tradizionale. Molti formaggi fermentati italiani come il Grana Padano e il Parmigiano Reggiano posseggono il marchio DOP, altri insaccati fermentati come il Salame Felino e il Salame Cremona posseggono il marchio IGP, e numerose bevande fermentate come vari vini italiani posseggono o il marchio DOP o il marchio IGP.

Ciascun alimento fermentato o bevanda fermentata è caratterizzato da un peculiare microbiota originato dalle materie prime, dalle attrezzature e dall'ambiente di lavorazione, la cui composizione ed evoluzione sono influenzate da fattori biotici e abiotici che intervengono durante ogni specifico processo di



Vincenzina Fusco

è primo ricercatore presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ISPA).



Daniele Chieffi

è Assegnista di Ricerca presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ISPA).



produzione. Tale consorzio microbico assicura sia le attività di fermentazione primarie, che garantiscono i risultati tecnologici della trasformazione, sia quelle accessorie, che contribuiscono notevolmente alla definizione delle caratteristiche di tipicità e qualità, basi della notorietà dei prodotti fermentati. Sono stati riscontrati diversi consorzi microbici specifici per l'area geografica di origine. Per questo motivo, i microorganismi, ed in particolare il loro DNA, possono essere usati come marker per valutare l'autenticità di alimenti e bevande fermentati DOP e IGP (Figura 1).

Metodi di identificazione basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'amplificazione mediante PCR del gene 16S rRNA, e la successiva analisi della sua sequenza nucleotidica, sono state ampiamente utilizzate per identificare batteri di origine alimentare. Tuttavia questo metodo potrebbe non consentire l'identificazione accurata di specie strettamente correlate dal punto di vista filogenetico. I saggi PCR volti invece ad amplificare frammenti di geni specie-specifici, anche diversi dai geni 16S rRNA, hanno accelerato e reso più accurato il processo di identificazione. Inoltre, mentre l'analisi di sequenza del gene 16S rRNA richiede classicamente un primo passaggio di isolamento del batterio bersaglio prima dell'estrazione del DNA, la PCR specie-specifica può essere coltura-indipendente, ossia essere eseguita direttamente sul DNA estratto dall'alimento.

Metodi di tipizzazione basati sulla PCR e sequenziamento genomico

L'identità di un microorganismo usato a scopo tecnologico, e/o probiotico, dovrebbe essere determinata non solo a livello di specie ma anche di ceppo.

La RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) PCR prevede l'amplificazione del DNA non mirata a specifiche sequenze bersaglio, ma bensì a regioni casuali del DNA. La AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) PCR

è basata invece sulla combinazione di due diverse fasi: la preliminare digestione del DNA con enzimi di restrizione, e la successiva amplificazione selettiva dei frammenti ottenuti. RAPD- e AFLP-PCR sono tecniche di genotipizzazione che forniscono così profili di bande polimorfiche che consentono la discriminazione del ceppo. Tuttavia, l'analisi dell'endonucleasi di restrizione mediante elettroforesi su gel in campo pulsato (*Restriction Endonuclease Analysis-Pulsed-Field Gel Electrophoresis, REA-PFGE*), mediante la quale i frammenti ottenuti dall'endonucleasi di restrizione del DNA genomico vengono direttamente risolti mediante PFGE, evita gli svantaggi della PCR fornendo profili di bande polimorfiche, denominati pulsotipi, ed è considerata la tecnica "gold standard" per la genotipizzazione.

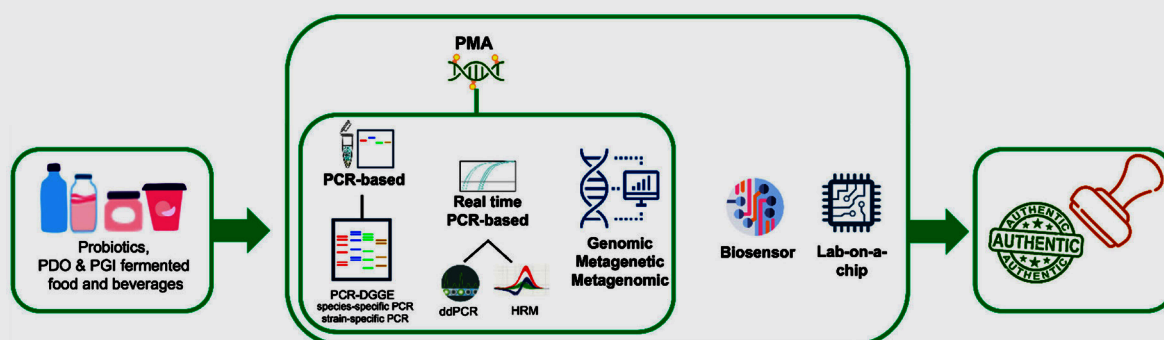
Il sequenziamento dell'intero genoma (*whole genome sequencing, WGS*) consente l'identificazione di un microorganismo target sia a livello di specie che di ceppo. Inoltre, l'analisi dei dati WGS permette di effettuare una valutazione genetica della sicurezza e anche del potenziale probiotico del microorganismo. In aggiunta, analizzando interi genomi, è possibile rilevare sequenze specifiche del ceppo che possono essere utilizzate per disegnare primer e sonde per saggi PCR, anche di tipo real time, consentendo l'identificazione e la quantificazione tempestive di ceppi microbici target in alimenti fermentati.

Metodi basati sulla PCR in tempo reale (real time PCR)

La PCR in tempo reale (*real time PCR*), tecnica rapida, robusta e sensibile, è ampiamente applicata per indagare l'autenticità di alimenti fermentati. Con questa tecnica è possibile quantificare in "tempo reale" un determinato microorganismo presente nell'alimento grazie al monitoraggio di un segnale fluorescente direttamente proporzionale alla quantità di DNA target presente nel campione.

La *digital droplet PCR* (ddPCR) è una tecnica di PCR che suddivide i campioni contenenti il DNA in migliaia di goccioline che costituiscono camere di reazione separate. La ddPCR fornisce i mezzi per rilevare il numero assoluto di

Figura 1. Schema di funzionamento delle tecnologie basate sul DNA per l'autenticazione di prodotti probiotici, alimenti e bevande fermentati DOP e IGP



molecole di DNA o RNA in ciascun campione, rendendo teoricamente il saggio più preciso e sensibile. Sono stati progettati primer e sonde specifici per specie e persino per ceppo per consentire l'identificazione e la quantificazione basata su real time PCR e ddPCR dei microrganismi tecnologici e per consentire l'autenticazione di alimenti fermentati. Tuttavia, i metodi basati sul DNA non discriminano tra microrganismi vitali e non vitali. Il propidio monoazide (PMA), con la sua capacità di penetrare le membrane cellulari compromesse, lega covalentemente il DNA delle cellule non vitali o danneggiate; e l'addotto risultante non è amplificabile mediante PCR. La *PMA-real time* PCR consente quindi il rilevamento quantitativo tempestivo solo di microrganismi vitali ed è uno strumento che può essere così applicato per l'autenticazione di alimenti probiotici e fermentati DOP e IGP.

DNA-based biosensors e lab-on-a-chip devices

Questi dispositivi combinano un elemento biologico sensibile (il recettore) con un trasduttore chimico o fisico per rilevare selettivamente e quali-quantitativamente la presenza di uno specifico composto in un dato ambiente. Le proprietà intrinseche del DNA, come la sua elevata specificità e la possibilità di rilevamento ottico, elettrico o meccanico, lo rendono un candidato eccellente per il suo utilizzo in questo tipo di applicazioni. Data la sensibilità e la robustezza intrinseca della PCR, il *biosensing* basato sulla PCR è frequentemente utilizzato.

La rapida evoluzione delle micro e nanotecnologie ha aperto nuovi orizzonti verso la miniaturizzazione delle piattaforme di rilevamento convenzionali, dando vita ai cosiddetti dispositivi *lab-on-a-chip*. Tuttavia, la PCR richiede uno strumento di termociclazione, che limita significativamente la potenziale miniaturizzazione del sistema. Per superare questo limite, vengono sviluppati metodi di amplificazione isoterma e integrati in dispositivi microfluidici. Lo sviluppo e l'impiego di queste piattaforme integrate sono però ancora essenzialmente limitati al rilevamento dei microrganismi patogeni. Gli evidenti vantaggi che però queste tecnologie possono apportare per rilevare anche microrganismi tecnologici e probiotici risiedono soprattutto nella riduzione dei volumi dei reagenti impiegati, e quindi dei costi associati, nonché nella velocità dei tempi di ottenimento dei risultati.

PCR-DGGE

L'amplificazione PCR di regioni variabili del gene 16S rRNA seguita da elettroforesi su gel in gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*) è un'altra tecnica frequentemente utilizzata negli ultimi decenni per indagare l'autenticità di alimenti e bevande fermentati. La PCR-DGGE permette di ottenere un pattern di ampliconi che teoricamente riflette la comunità microbica dell'alimento target e può essere specifico per l'area geografica di origine, consentendo così di valutare l'autenticità di ali-

menti e bevande DOP e IGP, e di consentire la tracciabilità di questi prodotti.

Metagenetica e metagenomica

L'analisi metagenetica dei geni 16S rRNA può consentire la caratterizzazione di alimenti fermentati e l'autenticazione di prodotti DOP e IGP. Essa consiste nell'amplificazione PCR dei geni 16S rRNA presenti nel DNA metagenomico estratto da un alimento, combinata con sequenziamento e allineamento rispetto a un database di riferimento per rilevare la composizione tassonomica di una comunità microbica.

Tramite la metagenomica *shotgun* viene invece sequenziato l'intero campione di DNA microbico estratto dall'alimento. Se il metodo di estrazione del DNA è efficiente, la metagenomica fornisce informazioni sulla presenza di svariati geni (non solo il 16S rRNA) e, inoltre, può permettere di ottenere interi genomi assemblati che possono fornire utili informazioni genomiche anche a livello di ceppo. Se combinata con la culturomica, la citometria a flusso o con l'uso di PMA, può portare alla caratterizzazione della comunità microbica vitale presente in prodotti probiotici e fermentati, anche DOP e IGP.

Conclusioni

Le tecnologie basate sul DNA sono strumenti preziosi per valutare l'autenticità di alimenti e bevande DOP e IGP fermentati. Ad oggi sono disponibili diversi metodi basati sul DNA ma, a seconda dell'obiettivo specifico, dell'attrezzatura disponibile e del budget, si dovrebbe scegliere di volta in volta il metodo più adeguato. Se l'obiettivo è valutare l'autenticità di alimenti e bevande probiotici e fermentati, i dispositivi *lab-on-a-chip* basati sull'amplificazione isoterma con PMA sono strumenti preziosi e appropriati che possono consentire il rilevamento quali-quantitativo in loco e tempestivo di microrganismi vitali di origine alimentare. Tuttavia, sebbene tali dispositivi siano molto promettenti, stanno venendo sviluppati ed utilizzati principalmente per il rilevamento di microrganismi patogeni. Pertanto, la valutazione dell'efficacia di questi dispositivi nel rilevamento quali-quantitativo di microrganismi tecnologici e/o probiotici rappresenta un fruttuoso ambito di ricerca per il prossimo futuro.

I saggi basati sulla PCR in tempo reale con PMA, potendo essere anche di tipo *multiplex*, consentono il rilevamento quali-quantitativo simultaneo di numerosi probiotici, colture starter o *adjunct*, direttamente da alimenti e bevande fermentati. Tuttavia, i primer e le sonde devono essere ceppo-specifici in modo da consentire il rilevamento quali-quantitativo degli specifici ceppi probiotici e/o tecnologici considerati. In questo contesto, vale la pena progettare primer e sonde basati sul genoma sequenziato di ogni ceppo target. Se la necessità è quella di valutare l'autenticità di alimenti e bevande fermentati DOP e IGP, è necessario utilizzare l'intero microbioma come marcatore di autenticità. In questo caso, a seconda del budget e delle attrezzature disponibili, è possibile utilizzare la metagenomica o la PCR-DGGE.

RIFERIMENTI RICERCA

Titolo

Tecnologie recenti e avanzate basate sul DNA per l'autenticazione di alimenti e bevande fermentati probiotici, a Denominazione di Origine Protetta (DOP) e a Indicazione Geografica Protetta (IGP).

Questo articolo è stato preparato nell'ambito del progetto bilaterale CNR-CONICET "Lactic Acid Bacteria as bioprotective agents against zoonotic pathogens in the meat chain" e nell'ambito del progetto: "L'Evoluzione delle Produzioni Lattiero-Casearie: le Biotecnologie valorizzano la Tradizione" – ELEVATO, n. F/200112/03/X45, Fondo per la Crescita Sostenibile – Sportello "Agrifood" PON I&C 2014-2020.

Autori

V. Fusco, F. Fanelli F, D. Chieffi

Fonte

Foods. 2023; 12(20):3782.

<https://doi.org/10.3390/foods12203782>



Abstract

L'autenticità di alimenti e bevande fermentati che posseggono lo status di "Denominazione di Origine Protetta" (DOP) o "Indicazione Geografica Protetta" (IGP) può essere valutata con numerosi metodi. Le tecnologie basate sul DNA sono emerse negli ultimi decenni come strumenti preziosi per ottenere l'autenticazione alimentare e sono in fase di sviluppo metodi e piattaforme di analisi sempre più avanzati. Il presente articolo si concentra sulle più recenti e avanzate tecniche basate sul DNA per l'autenticazione di alimenti e bevande fermentati DOP e IGP. Tra le tecnologie disponibili, le tecnologie basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale con propidio monoazide (PMA) consentono il rilevamento quantitativo e tempestivo dei microrganismi vitali. I lab-on-a-chip basati sul DNA sono dispositivi promettenti che possono essere utilizzati per il rilevamento quali-quantitativo in loco e puntuale dei microrganismi tecnologici. PCR-DGGE e metagenomica, anche combinati con l'uso di PMA, sono strumenti preziosi che consentono di ottenere informazioni sulla comunità microbica che caratterizza gli alimenti e le bevande fermentati DOP e IGP necessarie per la loro autenticazione.

Bibliografia essenziale

1. Danezis, G.P., Tsgkaris, A.S., Brusic, V., & Georgiou, C.A. (2016). Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*, 10, 22-31. Doi: 10.1016/j.cofs.2016.07.003.
2. Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.006.
3. Fusco, V., & Quero, G.M. (2014). Culture-dependent and -independent nucleic acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 493-537.
4. Giuffrida, M.C., & Spoto, G. (2017). Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: recent advances. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 174-186. doi: 10.1016/j.bios.2016.11.045.
5. Hou, Y., Chen, S., Zheng, Y., Zheng, X., & Lin, J.-M. (2023). Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116897.
6. Hua, Y., Ma, J., Li, D., & Wang, R. (2022). DNA-based biosensors for the biochemical analysis: a review. *Biosensors (Basel)*, 12, 183. doi: 10.3390/bios12030183.
7. Naresh, V., & Lee N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Basel)*, 21, 1109. doi: 10.3390/s21041109.
8. O'Donnell, S.T., Ross, R.P., Stanton, C. (2020). The progress of multi-omics technologies: determining function in Lactic Acid Bacteria using a systems level approach. *Frontiers in Microbiology*, 10:3084. doi: 10.3389/fmicb.2019.03084.
9. Wilhelm J, & Pingoud A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochemistry*, 4, (11):1120-8. doi: 10.1002/cbic.200300662.
10. Wittwer, C.T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutations*, 30, (6):857-9. doi: 10.1002/humu.20951.
11. Yap, M., Ercolini, D., Álvarez-Ordóñez, A., O'Toole, P.W., O'Sullivan, O., & Cotter, P.D. (2022). Next-generation food research: use of meta-omic approaches for characterizing microbial communities along the food chain. *Annual Reviews of Food Science and Technology*, 13, 367-84.