

AUTENTICAZIONE DI BRANZINI SELVATICI E ALLEVATI TRAMITE SPETTROSCOPIA DEL INFRAROSSO NIRs (NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY)

AUTHENTICATION OF WILD AND REARED SEA BASS BY INFRARED SPECTROSCOPY NIRs (NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY)

Novelli E.¹, Balzan S.¹, Tenti S.², Mirisola M.², Benozzo F.², Santomauro S., Fasolato L.¹

(¹) Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria;

(²) Dipartimento di Scienze animali – Università degli Studi di Padova

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate NIRs (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) performances in the prediction of Farmed vs. Wild production method in European sea bass. Samples collected (n=39) were submitted to analysis in order to assess chemical composition and fatty acids profile of fillets. Aliquots of wet and ground freeze-dried minced samples were scanned in duplicates (1100 to 2498 nm; 2 nm intervals) in reflectance mode using a monochromator NIRsystem 5000. NIRs technique showed a satisfactory accurateness in predicting Protein, Lipids and Fatty acids profile in raw samples. Sample lyophilisation increased some predicting values (r^2 : coefficient of determination on cross-validation range from 0,671 to 0,992; SECV: standard error of cross-validation range from 0,864 to 2,981). Results showed that NIRs technique was able to discriminate between Wild (94,7% samples recognized) and Farmed (100% samples recognized) using wet muscles, and 100% for both classes on ground freeze-dried fillet.

Key words

NIRs, Authentication, Farmed, Wild, sea bass, fatty acids

INTRODUZIONE

La scelta del consumatore e il grado di accettabilità del prodotto ittico sono fortemente influenzate dalle informazioni sull'origine e sul metodo di produzione. A questo riguardo la differenziazione tra prodotto selvatico e quello d'allevamento ha un forte impatto verso la promozione e lo stimolo all'acquisto del prodotto. È comune opinione considerare negativamente i pesci d'allevamento, quali alimenti poco genuini, spesso oggetto di trattamenti antibiotici e di qualità organolettica inferiore. Al contrario i prodotti di cattura sono valutati in modo molto favorevole, specialmente dai consumatori in fascia d'età medio-alta (1). L'allevamento intensivo può influenzare la qualità del prodotto che spesso presenta un elevato contenuto in lipidi nelle carni e depositi adiposi nella cavità celomatica, con ripercussioni sulle proprietà organolettiche. Inoltre, la progressiva so-

stituzione dell'olio e della farina di pesce con altri derivati di origine vegetale può indurre modificazioni nel profilo acidico del prodotto con la riduzione degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena e il concomitante aumento di acidi grassi C18 quali linoleico, alfa-linolenico e oleico. In aggiunta, la riduzione del quoziente n-3/n-6 può modificare il valore nutrizionale del prodotto (2). Il Regolamento CE 2065/2001 disciplina la rintracciabilità del prodotto ittico lungo la filiera e stabilisce le informazioni minime da fornire al consumatore in etichetta (3). Al momento della vendita l'acquirente deve poter conoscere la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione (pescato o allevato) e l'areale di cattura. La tracciabilità lungo la filiera ittica è una necessità di comune interesse avvertita anche da trasformatori e distributori di prodotto che richiedono maggiori garanzie ai fornitori per poter gestire in modo efficiente le nuove tecnologie produt-

tive, anche nell'ottica di certificazione di prodotto o processo. La richiesta di informazioni certe, e quindi verificabili, ha stimolato lo sviluppo di tecniche analitiche utili all'autenticazione di prodotto. Per quanto concerne la tipologia produttiva, lo studio del profilo acidico e dell'abbondanza in isotopi stabili del carbonio e dell'azoto hanno fornito eccellenti risultati, suggerendo tali metodiche come futuri strumenti impiegabili nell'attestazione di autenticità (4). Tuttavia un simile approccio ha il proprio limite nel tempo e nel costo delle analisi che non ne consentono un impiego routinario. Altre metodiche, quali il rilievo di tratti morfologici salienti, la composizione centesimale del prodotto e l'elettroforesi delle proteine non sembrano fornire risultati sufficientemente affidabili. Un sistema analitico alternativo è la Spettroscopia del vicino infrarosso NIRs (*Near Infrared reflectance Spectroscopy*). L'approccio NIRs è classificabile alla stregua di metodo multi-analitico alternativo (secondario) e ormai sinonimo di convenienza rispetto le tradizionali metodologie di laboratorio. Tale tecnica si basa sulla capacità di ogni matrice o composto chimico di assorbire, trasmettere e riflettere le radiazioni del vicino infrarosso e negli ultimi anni ha visto numerose applicazioni per la valutazione della qualità del prodotto ittico. Per citarne alcune si può ricordare la predizione del grasso e dell'acqua nel filetto di salmonidi d'allevamento; la discriminazione dell'origine, i cui risultati tuttavia risentono dell'effetto specie; la discriminazione della tipologia di allevamento, estensivo *vs* intensivo (5, 6). Il presente studio ha inteso verificare le potenzialità della tecnica NIRs nella classificazione del metodo di produzione Allevato *vs* Pescato di branzini (*Dicentrarchus labrax L.*) impiegando quale metodica di confronto *gold standard* lo studio del profilo acidico e la composizione centesimale del filetto tal quale.

MATERIALI E METODI

La raccolta dei campioni è avvenuta durante i mesi primaverili del 2008. Gli esemplari pescati (P; n=19) provenivano da mercati ittici all'ingrosso. L'origine dichiarata corrispondeva alle zone FAO 37.1 (Mar Mediterraneo) e FAO 27 (Oceano Atlantico nord-orientale). I campioni d'allevamento (A; n=20), prelevati durante il medesimo periodo, erano costituiti da 10 esemplari provenienti da tre allevamenti italiani ubicati nel Nord-Est d'Italia e 10 esemplari di provenienza greca. I campioni sono stati sfilettati e la frazione muscolare, dopo energica omogeneizzazione (mediante mulino da laboratorio Ret-

sch, 10s, 4.000 rpm), è stata impiegata senza discriminazione fra muscolatura rossa e bianca. Per l'analisi degli acidi grassi (FA) è stato estratto il grasso intramuscolare (7) e una sua frazione (20-40 mg) è stata esterificata con una soluzione 3N di HCl in metanolo (Sigma – Aldrich 3-3355, 1mL). L'identificazione dei singoli composti è stata effettuata mediante un gascromatografo Shimadzu 17A, con colonna capillare Omegawax 250 (30 m x 0,25 mm x 0,25 um), temperatura iniettore 260 °C, temperatura detector (FID) 260 °C, fase mobile elio 6.0, programmata della camera termostatica pari a 90 °C (isoterma iniziale), incremento di 3,7 °C/min, isoterma finale a 240 °C. La composizione centesimale del filetto è stata effettuata secondo metodo ufficiale per umidità, proteina (N-Kjeldahl x 6,25), estratto etereo (EE, Soxhlet, etere dietilico) e ceneri (8). La misura NIRs è stata effettuata sull'omogeneato muscolare, sia umido che liofilizzato, con lettura in riflettanza mediante strumento FOSS Nirsystem 5000 (1100-2500 nm, gap 2 nm) equipaggiato con "Small ring cup". La calibrazione è stata condotta impiegando il metodo *modified partial least square* (MPLS) ottimizzata con validazione incrociata. Per lo studio delle differenze statistiche tra le medie delle variabili dei campioni pescati ed allevati è stata impiegata ANOVA ad una via (P<0,05); è stato effettuato lo studio delle componenti principali (PCA) al fine di comprendere il peso di ciascuna variabile nel data set costituito (*factor loading* compreso tra > 0,7 e < -0,7). Sugli spettri sono stati eseguiti differenti trattamenti matematici quali *standard normal variate and detrend* (SNDV) e la derivatizzazione. L'analisi discriminante per il metodo di produzione è stata ottenuta mediante lo studio delle componenti principali dei dati spettrali.

RISULTATI

Le caratteristiche del data set ottenuto sono riportate nelle Tabelle 1 e 2. Come si nota in Tabella 1 tutti i parametri della composizione centesimale sono influenzati dal metodo di produzione. Gli esemplari allevati presentavano un elevato contenuto lipidico rispetto ai pescati ed una concomitante riduzione dell'umidità. La percentuale di proteina era significativamente inferiore nei pesci di cattura rispetto all'allevato (A: 18,99±0,6 *vs* P: 18,06±0,8; P<0,001). L'analisi statistica del profilo acidico ha evidenziato che nei branzini allevati vi è una significativa maggior percentuale di C14:0, C18:1n9; C20:1n9; C22:1n11; C18:2n6; C18:3n3; C20:2n6;

C20:3n3 e un minor contenuto in C16:0; C18:0; C16:1n7; C18:1n7; C20:4n6; C20:5n3; C22:5n3; C22:6n3. La percentuale in acidi grassi saturi è maggiore nei pesci pescati mentre i monoinsaturi sono più rappresentati nel muscolo dei pesci d'allevamento. Il contenuto in polinsaturi non sembra essere influenzato dal metodo di produzione. Sulla base delle 29 variabili studiate la prima e la seconda

componente principale (PC1 e PC2 rispettivamente) descrivono il 65% della variabilità osservata. Il contributo di ciascuna variabile è descritto in Tabella 2 dove i descrittori con maggior forza predittiva (n. 18 variabili) sono riportati in grassetto. Come si può notare tra i classici descrittori della qualità nutrizionale solo i lipidi, e di conseguenza anche l'umidità, sono ascrivibili tra quest'ultimi.

Tabella 1) Analisi statistica del data set ottenuto mediante ANOVA ad una via.

Tabella 2) Matrice dei pesi (*factor loading*) delle prime due componenti principali (PC1 e PC2) per ciascuna variabile allo studio.

Tabella 1		ANOVA		Tabella 2		PCA	
Composizione centesimale (%)	ALLEVATO	PESCATO	P	Composizione centesimale (%)	PC1	PC2	
N° osservazioni	20	19	-	N° osservazioni	20	19	
Umidità	72,50±1,7	77,35±1,4	<0,001	Umidità	0,916	-0,150	
Proteina	18,99±0,6	18,06±0,8	<0,001	Proteina	-0,533	0,433	
Lipidi	5,90±1,9	2,00±0,8	<0,001	Lipidi	-0,915	0,123	
Ceneri	1,25±0,1	1,19±0,1	0,001	Ceneri	-0,569	0,187	
Acidi grassi (% totale rilevati)				Acidi grassi (% totale rilevati)			
N° osservazioni	20	19	-	N° osservazioni	20	19	
C14:0	2,9±0,6	2,1±0,8	0,001	C14:0	-0,596	0,112	
C16:0	16,3±1,2	19,4±0,7	<0,001	C16:0	0,914	0,102	
C18:0	3,9±0,5	5,5±0,9	<0,001	C18:0	0,873	-0,192	
∑ saturi	23,1±1,3	27,0±0,8	<0,001	∑ saturi	0,887	-0,009	
C16:1 n7	4,5±0,7	5,3±1,4	0,022	C16:1 n7	0,380	0,614	
C18:1 n9	19,8±1,4	14,8±2,8	<0,001	C18:1 n9	-0,816	0,368	
C18:1 n7	2,7±0,3	4,1±0,8	<0,001	C18:1 n11	0,870	0,307	
C20:1 n9	3,4±1,2	1,8±1,4	0,001	C20:1 n9	-0,336	0,737	
C22:1 n11	2,5±1,5	1,2±1,8	0,015	C22:1 n11	-0,200	0,796	
C22:1 n9	0,2±0,1	0,2±0,2	NS	C22:1 n9	-0,113	0,523	
∑ monoinsaturi	33,1±4,4	27,5±4,4	<0,001	∑ monoinsaturi	-0,416	0,844	
C18:2 n6	12,9±7,0	1,5±0,9	<0,001	C18:2 n6	-0,843	-0,521	
C18:3 n6	0,2±0,05	0,2±0,07	NS	C18:3 n6	-0,424	-0,057	
C18:3 n3	1,7±0,6	0,5±0,2	<0,001	C18:3 n3	-0,869	-0,454	
C20:2 n6	0,6±0,2	0,4±0,1	<0,001	C20:2 n6	-0,528	-0,471	
C20:3 n6	0,2±0,2	0,2±0,1	NS	C20:3 n6	0,277	-0,269	
C20:3 n3	0,5±0,2	0,3±0,2	<0,001	C20:3 n3	-0,213	0,696	
C20:4 n6	0,9±0,3	3,6±1,7	<0,001	C20:4 n6	0,847	-0,252	
C20:5 n3	7,9±1,5	9,6±2,1	0,007	C20:5 n3	0,574	0,362	
C22:5 n3	1,7±0,4	2,5±0,8	0,001	C22:5 n3	0,620	-0,017	
C22:6 n3	10,3±2,3	16,5±4,5	<0,001	C22:6 n3	0,790	0,039	
∑ polinsaturi	37,0±4,8	35,1±4,4	NS	∑ polinsaturi	-0,260	-0,797	
∑ n3	22,2±3,2	29,3±3,8	<0,001	∑ n3	0,869	0,039	
∑ n6	14,2±6,9	5,5±2,3	<0,001	∑ n6	-0,774	-0,599	
n3/n6	2,2±1,5	6,4±3,0	<0,001	n3/n6	0,794	0,593	

Il dato è espresso come media±DS; NS= non significativo (P>0,05); P: significatività. I caratteri in **grassetto** sono i principali descrittori delle prime due componenti principali (*factor loading* > 0,7 e < -0,7).

Il profilo acido contiene altresì informazioni non rilevanti e alcuni acidi grassi, anche di notevole importanza nutrizionale quale è l'EPA, non sono considerati tra i maggiori descrittori nella matrice dei pesi. Come riportato nel grafico a plot delle due prime componenti principali (Figura 1) si osserva la completa separazione dei due gruppi studiati, in particolar modo la tipologia produttiva viene descritta principalmente dalla PC1. Le performance di Calibrazione NIRs sono riportate in Tabella 3. Esaminando i descrittori statistici quali l'errore standard

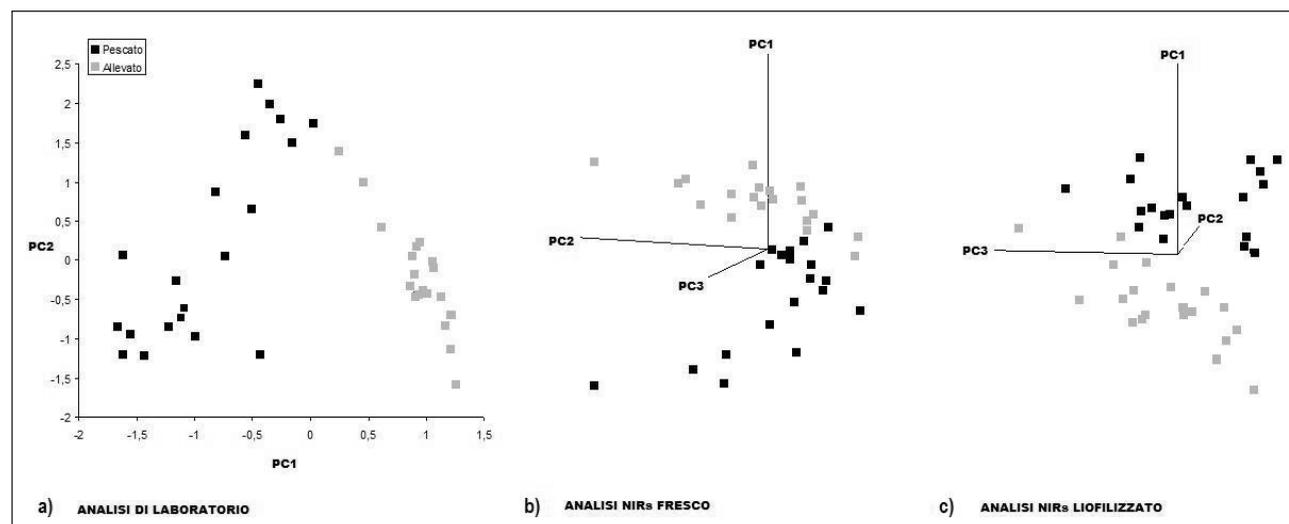
(SECV) e il coefficiente di determinazione in cross validazione (r^2) si evidenzia che la liofilizzazione incrementa la capacità discriminativa tra prodotto pescato e allevato, questo risulta evidente anche dai grafici delle prime tre componenti principali (Figura 1 b e 1 c). Al contrario, il trattamento sembra ridurre la capacità di stima analitica per alcuni componenti quali grasso e proteine, come descritto dalla riduzione del rapporto RPD (9) mentre si osserva l'incremento della capacità predittiva per tutti gli indici degli acidi grassi (la stima è robusta per valori > 3).

Tabella 3) Performance di calibrazione e cross validazione del data set allo studio.

Muscolo macinato tal quale	N. spettri medi impiegati	SEC	R²	SECV	r²	RPD
Discriminante (A vs. P)	38	0,137	0,927	0,249	0,755	-
Parametri						
Proteina	36	0,030	0,999	0,246	0,914	3,47
Lipidi	37	0,174	0,995	0,273	0,988	8,98
∑ saturi	38	1,146	0,733	1,324	0,640	1,68
∑ monoinsaturi	38	2,353	0,801	3,537	0,561	1,47
∑ polinsaturi	38	3,602	0,397	4,132	0,238	1,13
n3	38	0,408	0,993	2,390	0,756	2,08
n6	38	1,723	0,927	3,749	0,653	1,80
Muscolo macinato liofilizzato	N. spettri medi impiegati	SEC	R²	SECV	r²	RPD
Discriminante (A vs. P)	39	0,106	0,956	0,198	0,843	-
Parametri						
Proteina	39	0,734	0,988	0,864	0,984	0,99
Lipidi	38	0,636	0,993	0,711	0,992	3,45
∑ saturi	38	0,790	0,873	1,065	0,767	2,09
∑ monoinsaturi	39	2,208	0,820	2,981	0,671	1,74
∑ polinsaturi	36	0,758	0,974	1,892	0,840	2,48
n3	39	1,146	0,947	1,539	0,905	3,23
n6	39	0,805	0,986	2,595	0,850	2,60

SEC: errore standard in calibrazione; R²: coefficiente di determinazione in calibrazione; SECV: errore standard in cross-validazione; r²: coefficiente di determinazione in cross validazione; RPD: DS/SECV.

Figura 1: Grafico a plot delle prime due componenti principali categoriali delle analisi di laboratorio a) a confronto con i grafici a plot delle prime tre componenti principali dei dati spettrali NIRs del muscolo macinato fresco b) e liofilizzato c).



Per quanto concerne la capacità discriminante i due gruppi, l'analisi spettroscopica dell'omogenato umido ha fatto segnare un solo errore di attribuzione (un esemplare Pescato assegnato al gruppo Allevato). La misura condotta sull'omogenato liofilizzato non ha comportato alcun errore di assegnazione, riducendo così l'incertezza.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La percentuale di variabilità spiegata dalle prime due componenti principali relative alle misure di laboratorio è risultata superiore a quella riportata in un altro studio di autenticazione della tipologia produttiva di branzini mediante l'impiego di isotopi stabili e acidi grassi (4). Le variabili allo studio possono quindi essere considerate validi marcatori per la discriminazione fra Allevato e Pescato. Le stime predittive NIRs ottenute in questa sperimentazione sono in linea con studi preliminari di valutazione del profilo acidico in pesci marini d'allevamento ottenute in modalità analoga (10). Tale applicazione permette quindi uno studio multi-analitico dei principali descrittori della qualità nutrizionale del pesce, e potrebbe essere impiegata nel rapido ed economico monitoraggio del prodotto ittico. Il trattamento di liofilizzazione migliora le performances del sistema NIRs come osservato anche in uno studio di discriminazione del metodo di allevamento del branzino (intensivo, semi-intensivo, estensivo in gabbia galleggiante; 6). Gli Autori hanno attribuito al regime alimentare condizionato e alla combinazione di altri fattori quali la qualità delle acque e l'attività muscolare le variazioni spettrali osservate. Nel presente studio le performance di classificazione sono risultate ottimali sia sul prodotto umido che liofilizzato raggiungendo un livello di certezza nell'identificazione pari al 100% dei campioni esaminati. La presente applicazione dovrà essere opportunamente validata con un set di campioni incogniti per verificare la robustezza della curva di calibrazione ottenuta e consentirne un uso routinario.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Verbeke, W., Sioen, I., Pieniak, Z., Van Camp, J., De Henauw, S. (2005). Consumer perception versus scientific evidence about health benefits and safety risks from fish consumption. *Public health nutrition*, 8, 422-429
- 2) Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Ginés, R., Izquierdo M.S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248, 121-134
- 3) 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
- 4) Bell J. G., Preston T., Henderson R.J., Strachan F., Bron J. E, Cooper K., Morrison D. J (2007). Discrimination of Wild and Cultured European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Using Chemical and Isotopic Analyses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55, 5934-5941
- 5) Cozzolino D, Murray I, Scaife J R (2002). Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of chemical characteristics of minced raw fish. *Aquaculture Nutrition* 8, 1-6
- 6) Xiccato, G., Trocino, A., Tulli, F., Tibaldi, E., (2004). Prediction of chemical composition and origin identification of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Food Chemistry*. 86(2): 275-281
- 7) Folch, J., Less, M., Stanley, G. H. S. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". *J. Biol. Chem.* 226: 497-509
- 8) AOAC (2000) Official Methods of Analysis. Methods 950.46; 981.10; 960.39; 920.153. 17th ed., AOAC, Washington, DC
- 9) Williams, P.C. and Sobering, D. (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds). NIR Publications, Chichester, UK, pp. 185-188
- 10) Fasolato L., Berzaghi P., Serva L., Mirisola M., Corato A., Elia A.C., Franco S., Segato S. "Determination of fatty acid profile in reared marine fish by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)". *Proceeding of EAS Conference on Biotechnologies for Quality*, Barcelona, 20-23 October. *Special publication* 2004; (34), 336-337