



Approccio untargeted per lo studio del profilo lipidico del formaggio Camembert irradiato con raggi X

Maria Campaniello, Annalisa Mentana

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (IZSPB) –
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti (LNR ALIRR)

GR2018-12367064 *New Strategies for the evaluation of safety and quality of X-ray irradiated soft dairy products*
Progetto Giovani Ricercatori under 40 – finanziato dal Ministero della Salute

Secondo Workshop annuale del Laboratorio Nazionale di Riferimento per il trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti
26 Maggio 2022

GR2018- *New Strategies for the evaluation of safety and quality of X-ray irradiated soft dairy products*

SICUREZZA



Marker radiolitici, i 2-alchilciclobutanoni (2-ACB), mediante analisi HS-SPME/GC-MS (IZSPB)

Campaniello, M. et al., International Journal of Food Science and Technology, 2020; 55:961-969

Zianni, R. et al., LWT - Food Science and Technology 153 (2022) 112466

Sviluppo di metodi analitici, comprendenti estrazione e clean-up, e analisi UHPLC/HRMS per l'ottenimento del profilo lipidico e proteico completo e per l'identificazione di eventuali nuovi composti radioindotti (IZSPB)

QUALITÀ



Valutazione degli effetti dell'irraggiamento sul profilo delle sostanze volatili (VOC) dei formaggi a pasta molle in funzione dei diversi parametri di irraggiamento (UNIFG-dr.ssa R. Zianni)

INDAGINE

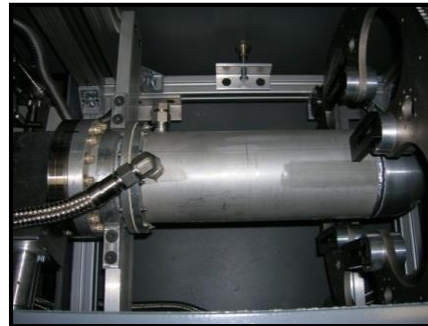


Indagine su diversi prodotti lattiero-caseari commerciali per identificare il trattamento di irraggiamento in prodotti non autorizzati e/o non correttamente etichettati e per individuare nuovi marker di irraggiamento (IZSPB – UNIFG)

Trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti



X-ray RS2400 (Rad Source Technologies, Texas, USA)



Food class/commodity assessed by the SCF	Overall average radiation dose (kGy)	Doses (kGy)
Fruits ^(a)	Up to 2	
Vegetables ^(a)	Up to 1	
Cereals ^(a)	Up to 1	
Starchy tubers ^(a)	Up to 0.2	
Spices & condiments ^(a)	Up to 10	
Fish & shellfish ^(a)	Up to 3	
Fresh meats ^(a)	Up to 2	
Poultry ^(a)	Up to 7	
Camembert cheeses manufactured from raw milk ^(b)		Up to 2.5
Frog's legs ^(c)	Up to 5	
Shrimps ^(c)		5
Gum arabic ^(c)		3
Casein / caseinates ^(c)		Up to 6
Egg white ^(c)		Up to 3
Cereal flakes ^(c)		10
Rice flour ^(c)		Up to 4
Blood products ^(c)	10	

(a): SCF (1986)

(b): SCF (1992)

(c): SCF (1998)

- Dose di radiazione assorbita: Gray (Gy) (Commissione internazionale sulle unità di radiazione)
- 1 Gy = 1 joule di energia per chilogrammo di materiale; 1 kGy è pari a 1000 joule per chilogrammo (di alimento)
- *basse dosi (≤ 1 kGy) per distruggere i parassiti*
- *dose media (1–10 kGy) per migliorare la durata di conservazione o ridurre/distruggere agenti patogeni o microrganismi deterioranti.*

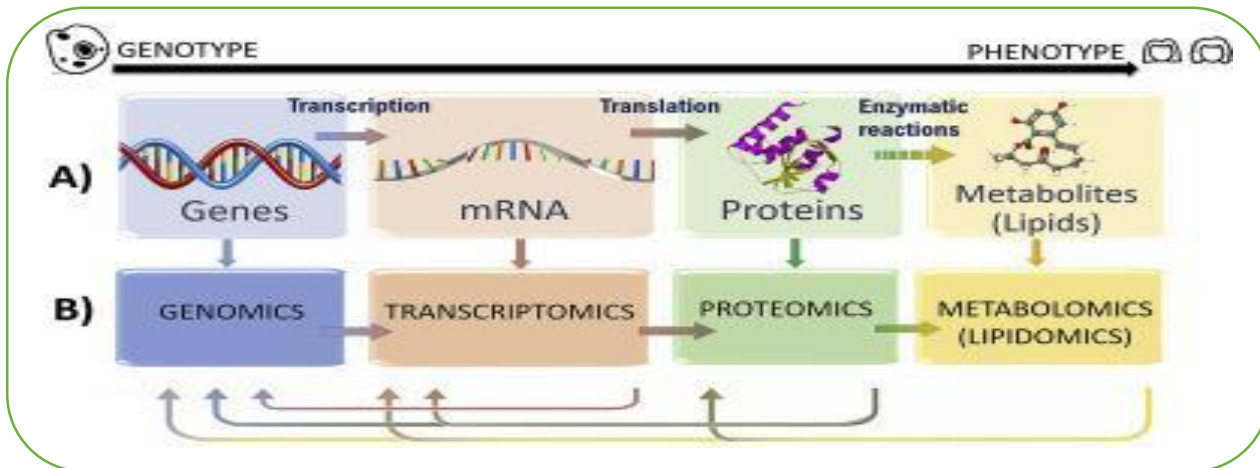
LE SCIENZE OMICHE

La scienze "omiche" raggruppano tutte quelle tecnologie che si basano su una visione olistica delle molecole che compongono una cellula, alimento o organismo. L'aspetto fondamentale di questi approcci è che un sistema complesso può essere compreso più a fondo se considerato nel suo complesso con i flussi e le relazioni tra le diverse componenti

Il suffisso "omica" viene generalmente utilizzato per indicare la totalità di quanto indicato nel prefisso (es. gen-omica, tutto sul genoma)

L'11 luglio 2018 si è insediato, presso la Direzione generale della prevenzione sanitaria, il Coordinamento Inter-Istituzionale che ha il compito di attuare il "Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze omiche"

Le scienze "omiche" non sono ambiti e discipline statiche, ma si evolvono parallelamente all'evoluzione delle tecnologie analitiche



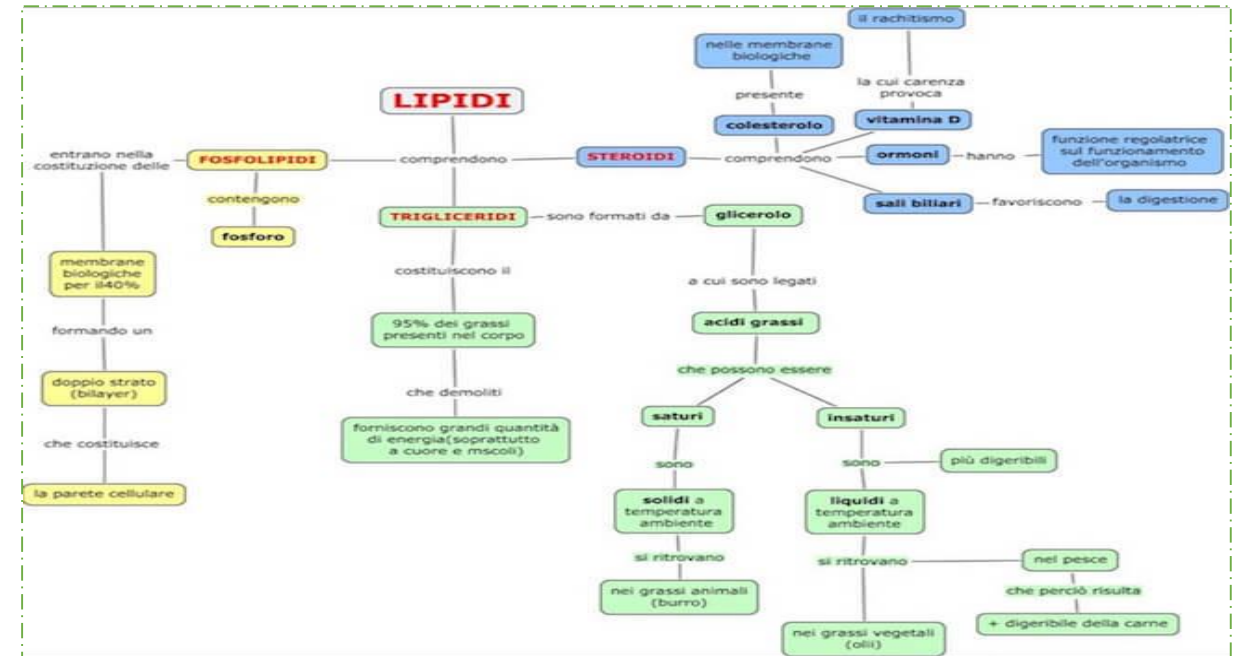
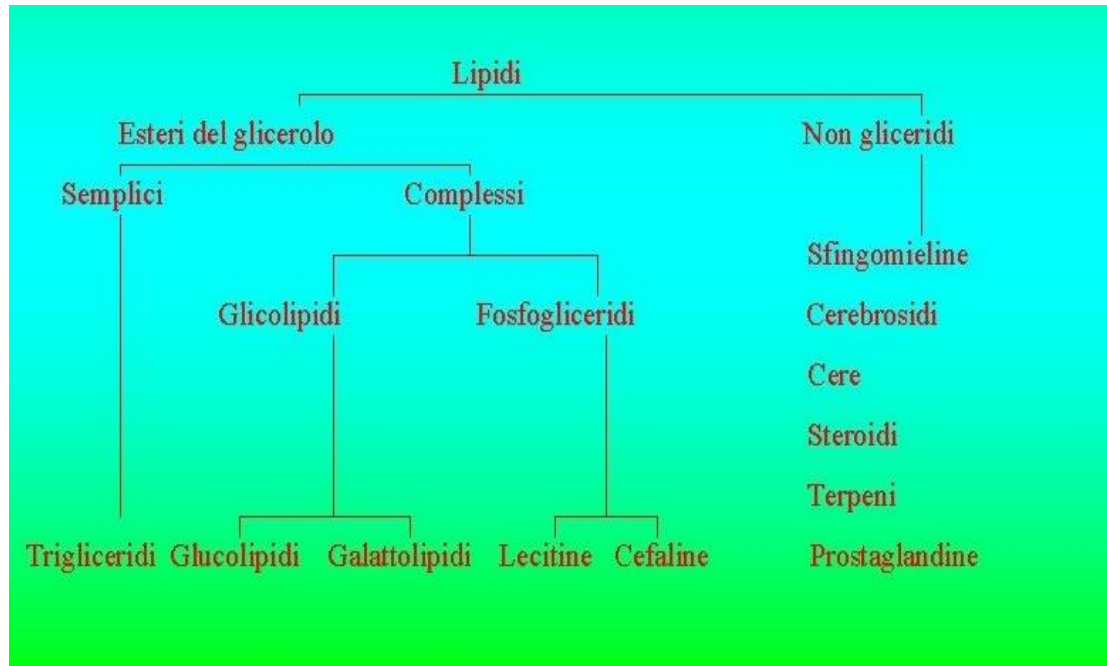
Mentre il genoma è costante per una data cellula, identico per tutte le cellule di un organismo e non cambia molto all'interno di ogni specie, il proteoma e il lipidoma sono molto dinamici nel tempo e in risposta a fattori esterni

LA LIPIDOMICA

LIPIDI

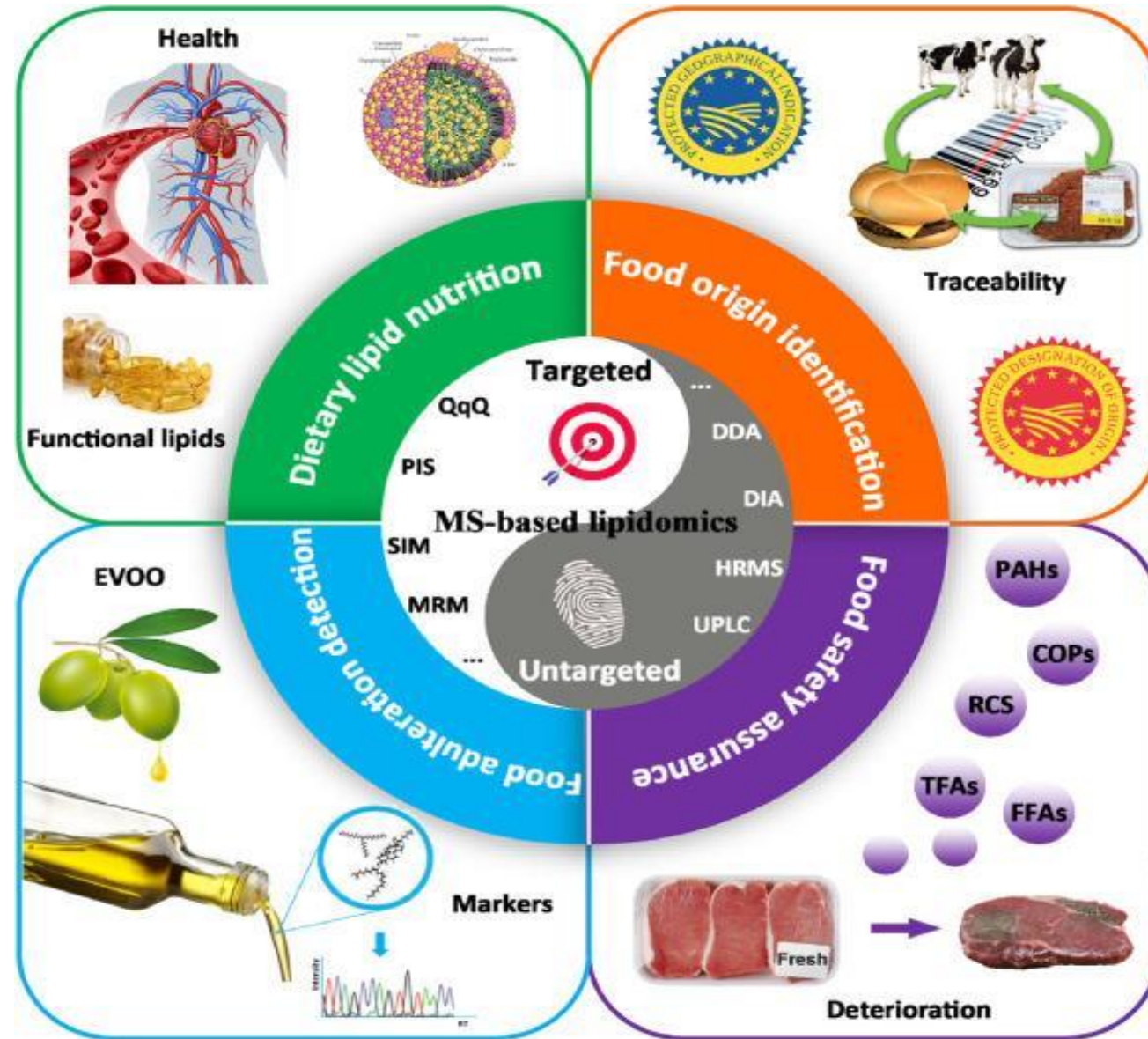
Il termine lipidi deriva dal greco lipos, che significa appunto grasso

I lipidi comprendono numerose sostanze con caratteristiche e proprietà diverse, insolubili in acqua e solubili nei solventi organici

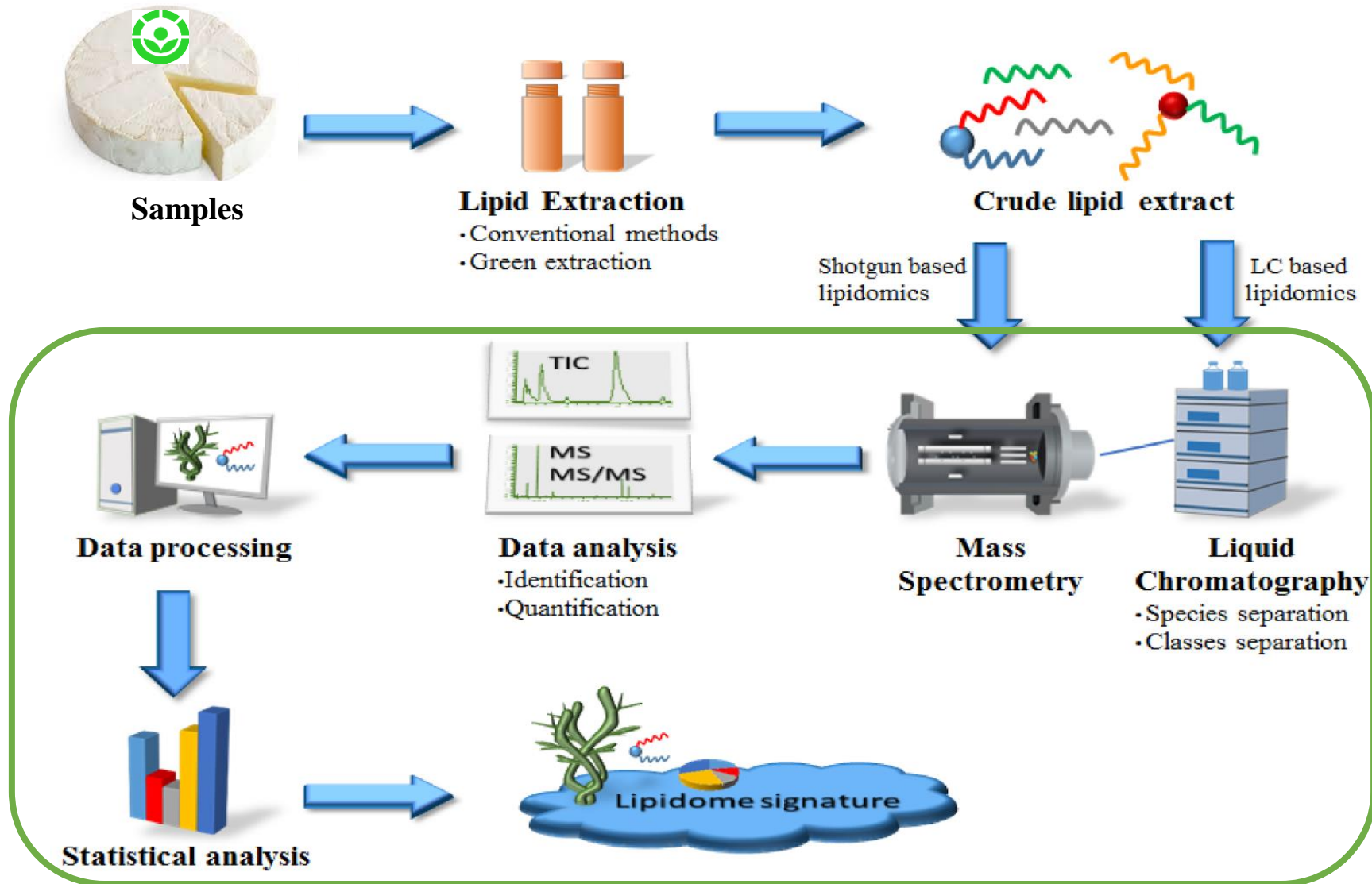


Lipidomica è lo studio su larga scala dei percorsi e delle reti dei lipidi cellulari nei sistemi biologici. La parola "lipidoma" è usata per descrivere il profilo lipidico completo all'interno di una cellula, tessuto, alimento, organismo o ecosistema ed è un sottoinsieme del metaboloma

LA LIPIDOMICA



LA LIPIDOMICA untargeted



-determina il peso molecolare di un composto con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che si chiama comunemente la massa esatta.

-delucida la struttura molecolare

-accoppiato con HPLC per la separazione delle componenti di una miscela

-condurre indagini quantitative

Caso studio: CAMEMBERT



Il Camembert è un formaggio francese con una crosta bianca e fiorita (*Penicillium camemberti*) e una parte interna morbida e leggermente liquida che matura prima vicino alla crosta.

Food class/commodity assessed by the SCF	Overall average radiation dose (kGy)	Doses (kGy)
Fruits ^(a)	Up to 2	
Vegetables ^(a)	Up to 1	
Cereals ^(a)	Up to 1	
Starchy tubers ^(a)	Up to 0.2	
Spices & condiments ^(a)	Up to 10	
Fish & shellfish ^(a)	Up to 3	
Fresh meats ^(a)	Up to 2	
Poultry ^(a)	Up to 7	
Camembert cheeses manufactured from raw milk ^(b)		Up to 2.5
Frog's legs ^(c)	Up to 5	
Shrimps ^(c)		5
Gum arabic ^(c)		3
Casein / caseinates ^(c)		Up to 6
Egg white ^(c)		Up to 3
Cereal flakes ^(c)		10
Rice flour ^(c)		Up to 4
Blood products ^(c)	10	

(a): SCF (1986)
(b): SCF (1992)
(c): SCF (1998)

Per il formaggio Camembert:

- Per prevenire un'ulteriore crescita di *Penicillium roqueforti*, è stata raccomandata una dose minima di 2,0 kGy;
- 2,6 kGy che non altera le proprietà organolettiche, permette una riduzione del patogeno *Listeria monocytogenes*

Procedura di irraggiamento:

Aliquote di formaggio Camembert (20g) irradiate in buste di plastica

- L'irraggiamento è stata eseguito operando a 150 kV e 45 mA a temperatura ambiente.
- I livelli di dose utilizzati per il trattamento con radiazioni a raggi X erano: 1,0, 2,0 e 3,0 kGy a un tasso di dose di circa 2 kGy h⁻¹.
- Aliquote di formaggio Camembert non irradiate sono state utilizzate come controllo (NI).

ESTRAZIONE LIPIDICA

Metodo FOLCH modificato:

mix di solventi costituito da $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ in un rapporto volumetrico di 8:4:3 (v/v/v)

0,5 g di Camembert omogeneizzato + 150 μl di Trionanoina 1000 mg/ml

Aggiunta di 19 ml di $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1), agitazione in vortex 15 min e centrifugare a 4°C per 30 min a 4500 rpm

x 2

Lavaggio con 9,5 ml di H_2O e il mix lasciato una notte a 4°C

Rimozione della fase superiore ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$)

Centrifugazione 4°C per 10 min a 4500 rpm

Filtrazione della fase inferiore (CH_3Cl) mediante carta da filtro Whatman (125 μm) e contenente una pochi mg di Na_2SO_4 come agente essiccante

Evaporazione del solvente con N_2

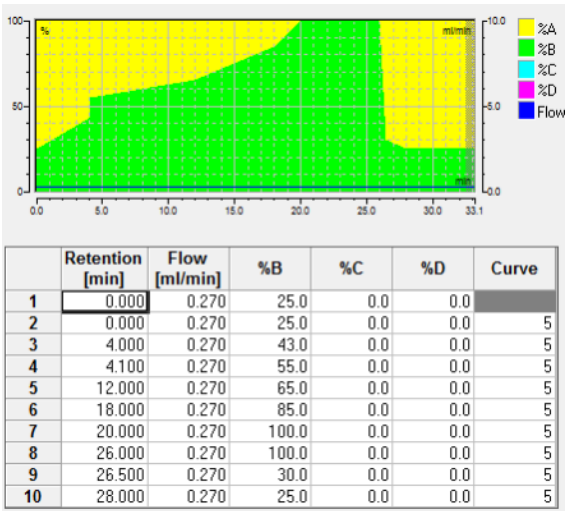
0,05 g di campione essiccato in 5 ml di $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) e quindi diluizione 1:5 in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (20:80)

ANALISI UHPLC-Q-Orbitrap-MS

Column and security guard column: Accucore C30 column (150 x 2.1 mm 2.6 µm column, Thermo) with a security guard column ULTRA Cartridges UHPLC wide-pore C18 (AJ0-8769, 2 × 4.6 mm ID, with sub-2 µm particles, Phenomenex)

- Eluizione in gradiente binario :
- ❖ Eluente "A" CH₃CN: H₂O, 60:40, v/v, 10 mM NH₄HCO₂ and 0.1% HCOOH
 - ❖ Eluente "B" CH₃CH(OH)CH₃: CH₃CN, 90:10, v/v 10 mM NH₄HCO₂ and 0.1% HCOOH

Flusso 270 µL/min e temperatura del campione 18°C



Gradiente di eluizione

UHPLC+ Focused Ultimate 3000 liquid chromatograph coupled to Q Exactive Focus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

PARAMETRI	Setting
Scan range (m/z)	150-2000
Full scan resolution (FWHM)	70000
Multiple data-dependent (dd-MS ²) scan resolution (FWHM)	17500
Injection volume (µl)	2 (+); 4 (-)
Spray voltage (kV)	3.4 (+); 3.2 (-)
Capillary temperature (°C)	290
Auxiliary gas heater (Arb)	290
Sheath gas (Arb)	32
Auxiliary gas (Arb)	8
Sweep gas (Arb)	0
S-lens RF level	50
AGC Target	1e6
Maximum Injection time (ms)	50
AGC target for dd-MS ²	2e5
Maximum Injection time (ms) for dd-MS ²	80
Dynamic exclusion (s)	2,5 (+), 3 (-)

DATA PROCESSING



SEARCH

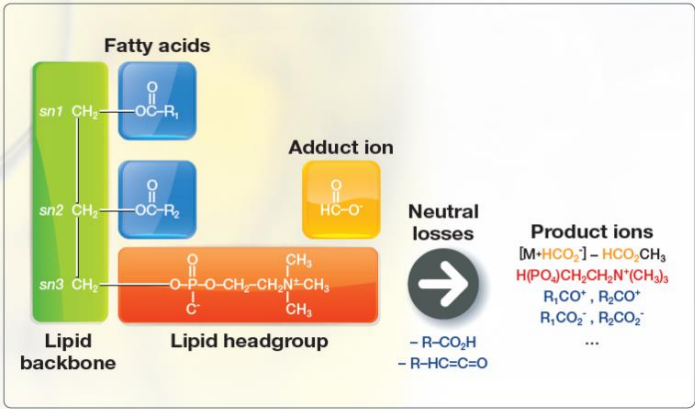
+

ALIGNMENT

1 step : DATA PROCESSING

SearchType	<input type="radio"/> Parent <input checked="" type="radio"/> Product <input type="radio"/> Target <input type="radio"/> Multi
ExpType	<input checked="" type="radio"/> LC-MS <input type="radio"/> Infusion
Parent tol	0.1 Da
NL/Prec tol	0.5 Da
Precursor tol	5.0 ppm
Product tol	8.0 ppm
Merge Range(min.)	2.0
Min Peak Width(min.)	0.0
Intensity threshold	parent 0.01
	threshold type <input checked="" type="radio"/> relative <input type="radio"/> absolute
	product ion 1.0 (%)
m-Score threshold	5.0

2 step: IDENTIFICATION



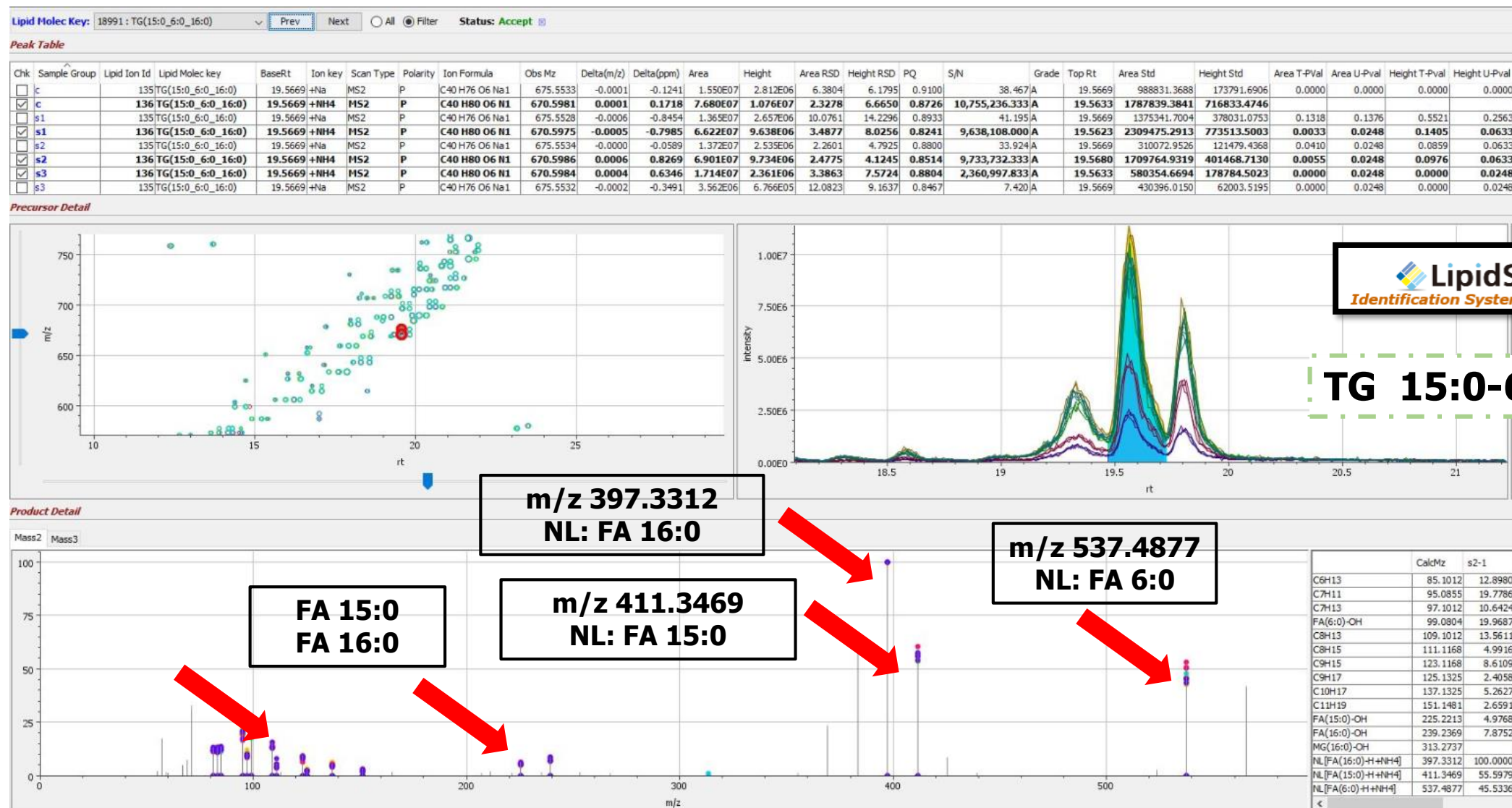
Per ogni spettro MS², i risultati della ricerca sono riepilogati, insieme a un punteggio che indica l'adattamento, per le specie lipidiche che corrispondono al modello di frammentazione previsto dal database.

I lipidi sono identificati in base alle principali unità strutturali delle molecole lipidiche tra cui la spina dorsale lipidica, il gruppo di testa, la composizione della catena di acidi grassi e gli ioni addotti all'interno di ciascuna modalità di polarità.

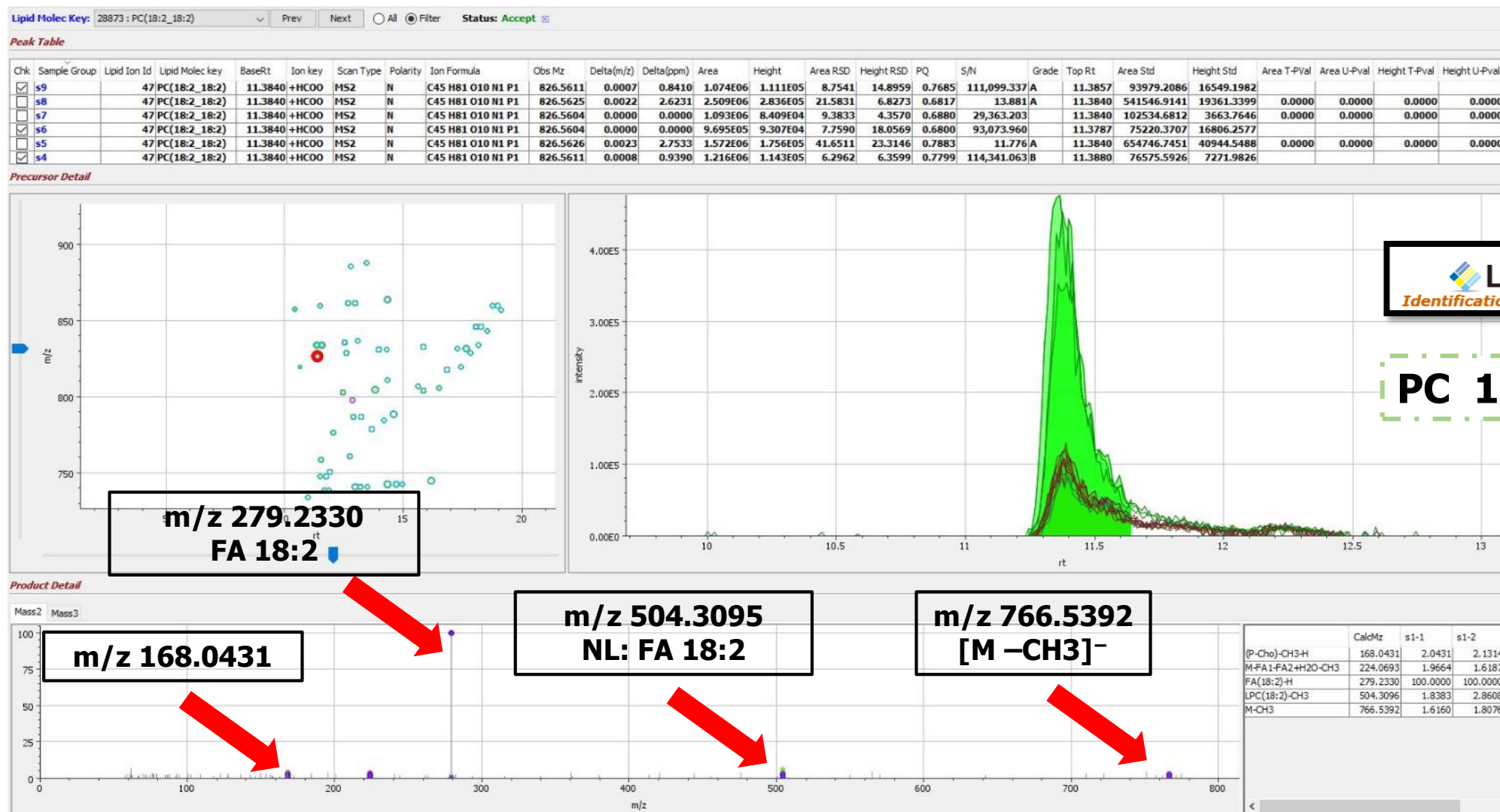
3 step: ALIGNMENT

Alignment Parameters	
Search Type	Product
ExpType	LC
Normalize type	NONE
Alignment method	MEAN
R.T. Tolerance	0.1
Calculate unassigned peak area	on
Filter type	New filter
Toprank filter	on
Main node filter	Main isomer peaks
m-score Threshold	5.0
c-score Threshold	2.0
ID Quality filter	[A,B,C,D]

DATA PROCESSING (Positivo)



DATA PROCESSING (Negativo)



LipidSearch
Identification System for Lipidomics

PC 18:2-18:2

RISULTATI

MODALITA' ACQU: NEGATIVA

CLASS		Negative
Cer	Ceramide	10
Cer Ox	Ceramide Oxidized	1
Hex1Cer	Hexosylceramide	7
Hex1Cer Ox	Hexosylceramide Oxidized	1
LPC	Lysophosphatidylcholine	1
LPE	Lysophosphatidylethanolamine	1
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol	1
PA	Phosphatidic Acid	5
PC	Phosphatidylcholine	11
PE	Phosphatidylethanolamine	15
PI	Phosphatidylinositol	9
PS	Phosphatidylserine	6
SM	Sphingomyelin	7



75

Addotti (-): -H; +HCOOH; -2H

MODALITA' ACQU: POSITIVA

CLASS		Positive
BisMePA	Bis-Methyl Phosphatidic Acid	1
ChE	Cholesterol Ester	1
DG	Diglyceride	15
DG Ox	Diglyceride Oxidized	1
Pet	Phosphatidylethanol	1
TG	Triglyceride	249
TG Ox	Triglyceride Oxidized	42



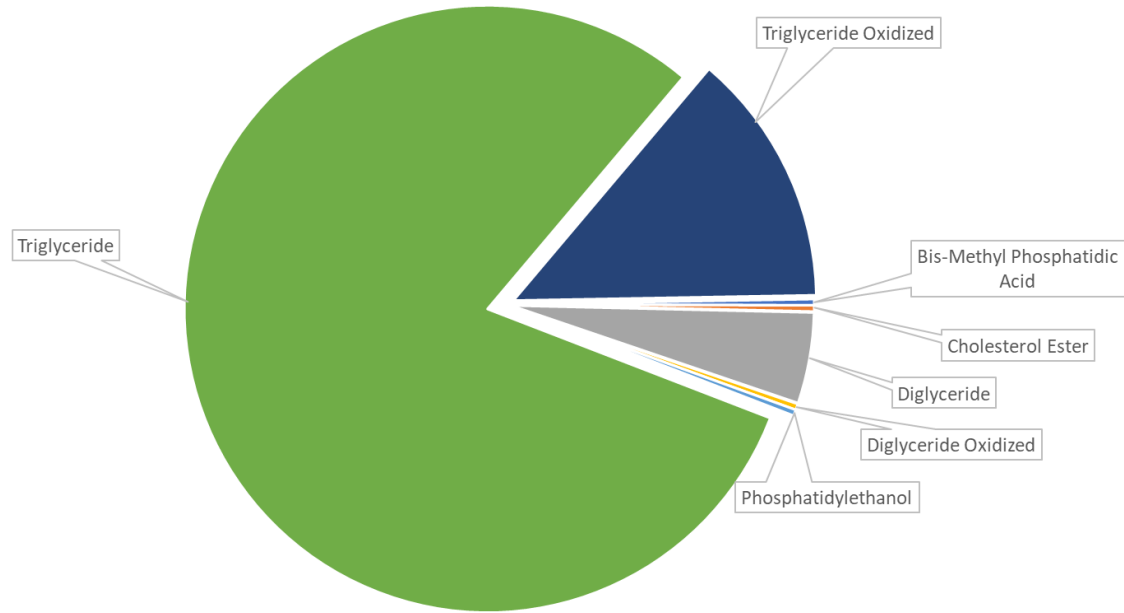
310

**Addotti (+): +H; +NH₄; +Na;
+H-H₂O; + H-2H₂O**

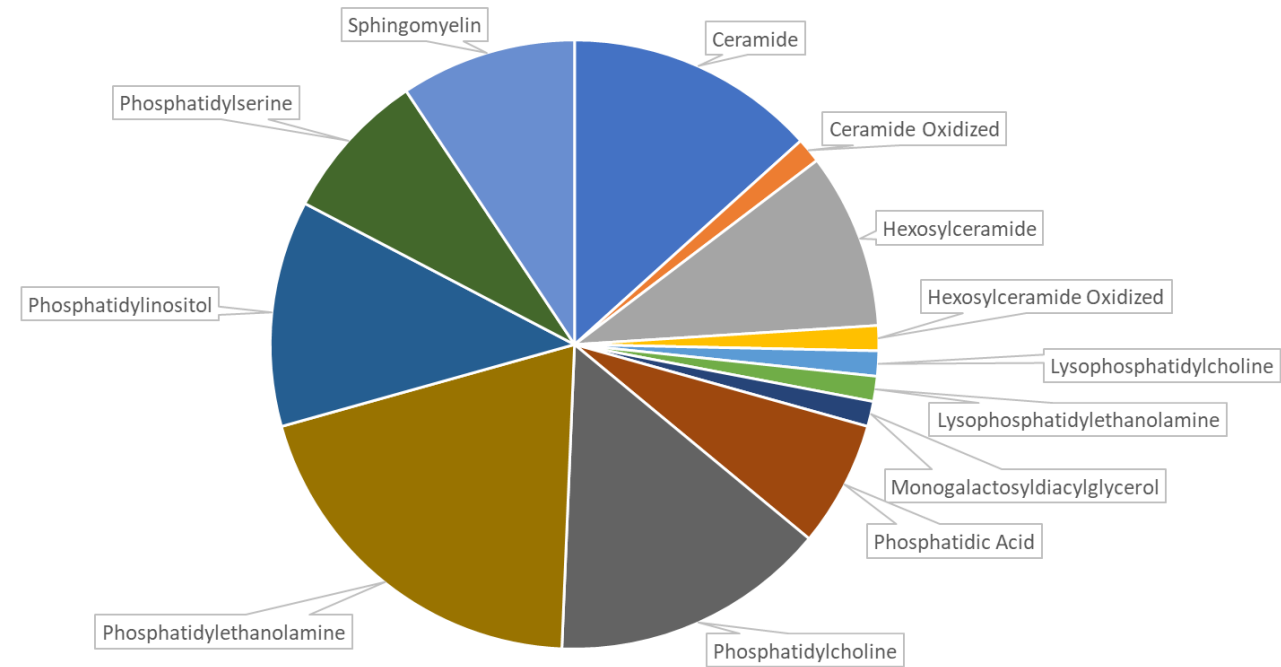


RISULTATI

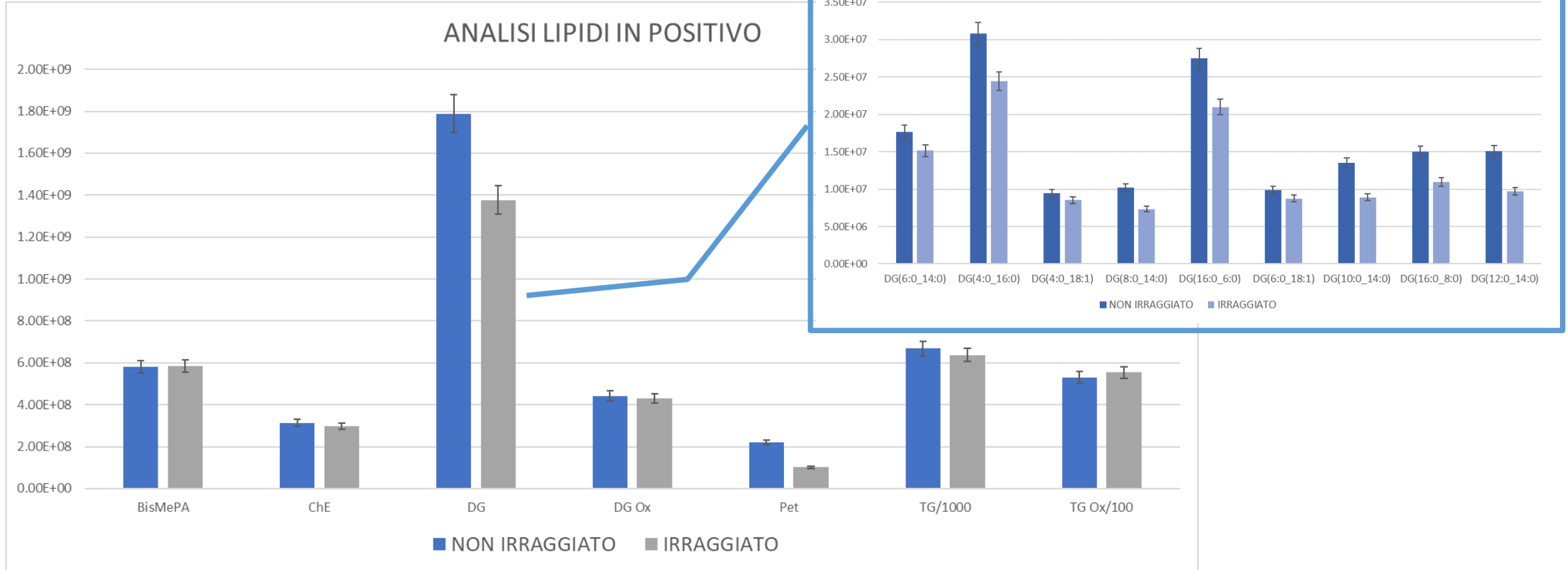
MODALITA' ACQU: POSITIVA



MODALITA' ACQU: NEGATIVA

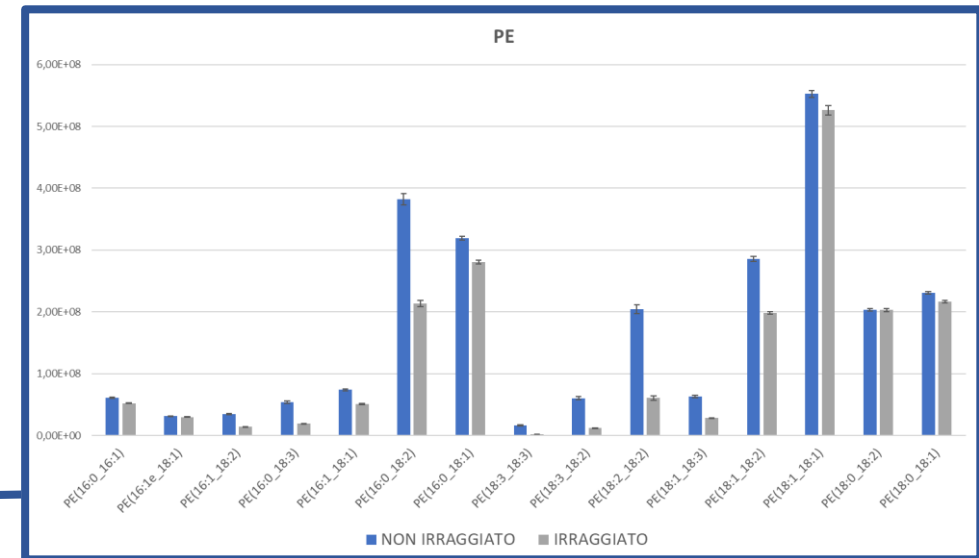
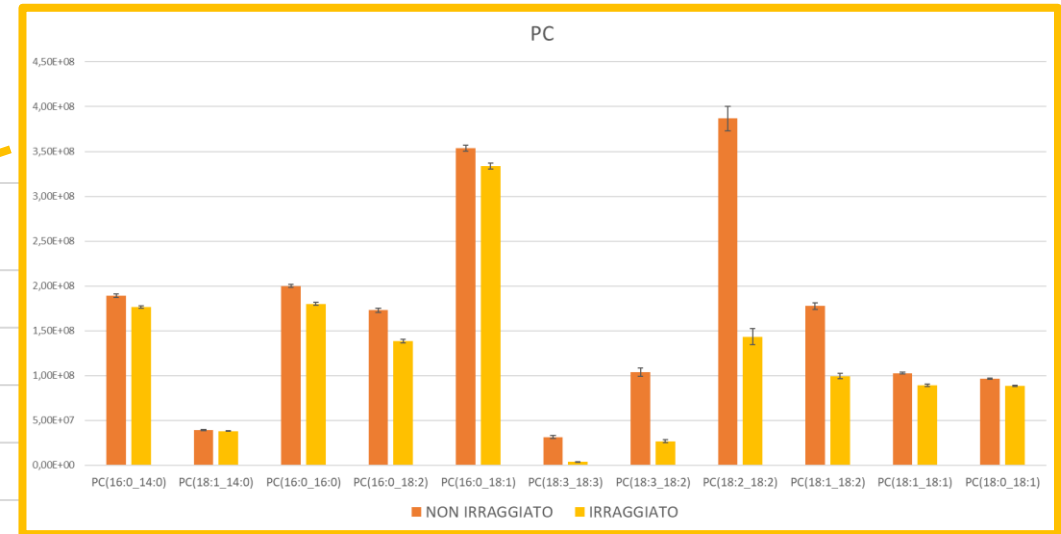
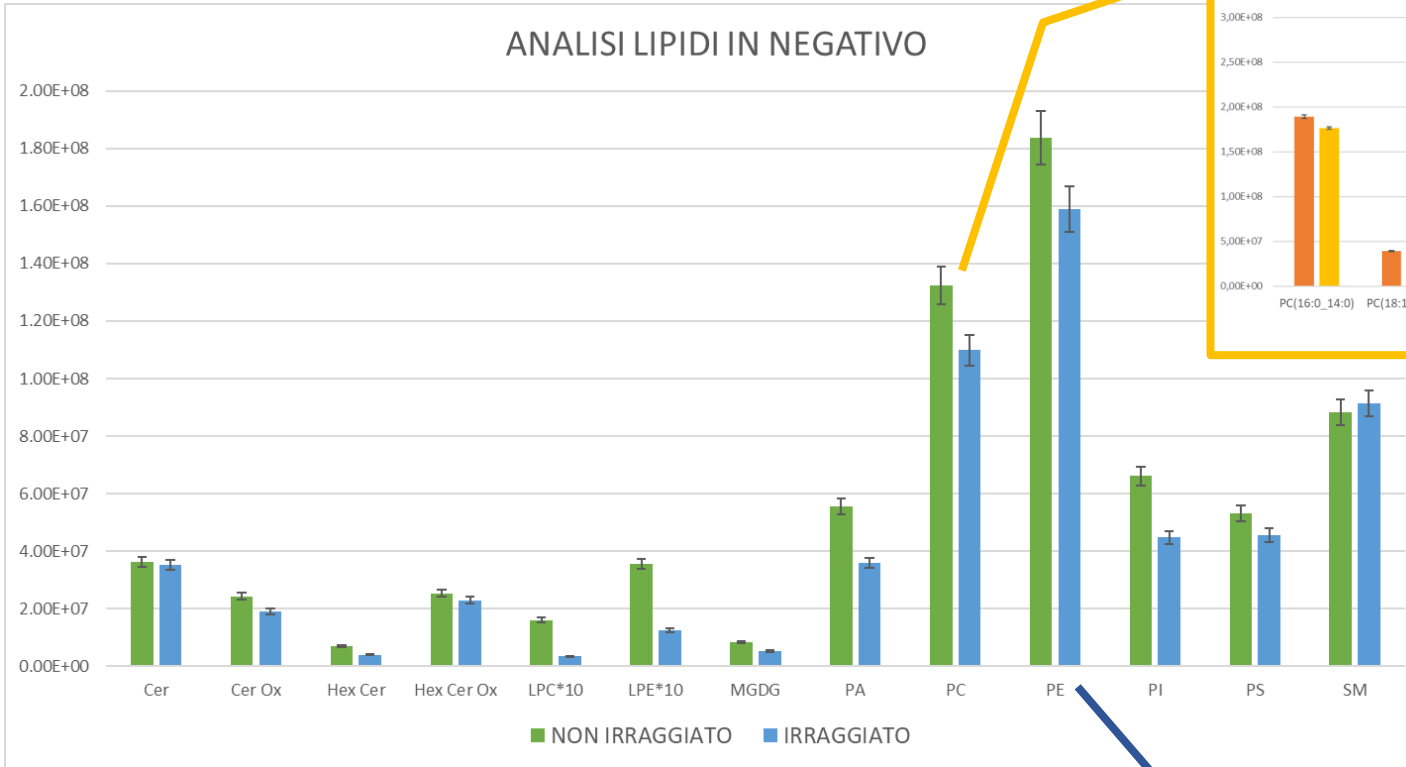


RISULTATI



RISULTATI

ANALISI LIPIDI IN NEGATIVO



RISULTATI

ANALISI CHEMIOMIOMETRICA DEI DATI RIFERITI A CAMPIONI NON IRRAGGIATI ED IRRAGGIATI (PLS-DA)

GRAFICO DISCRIMINANTE (ACQUISIZIONE IN POSITIVO)

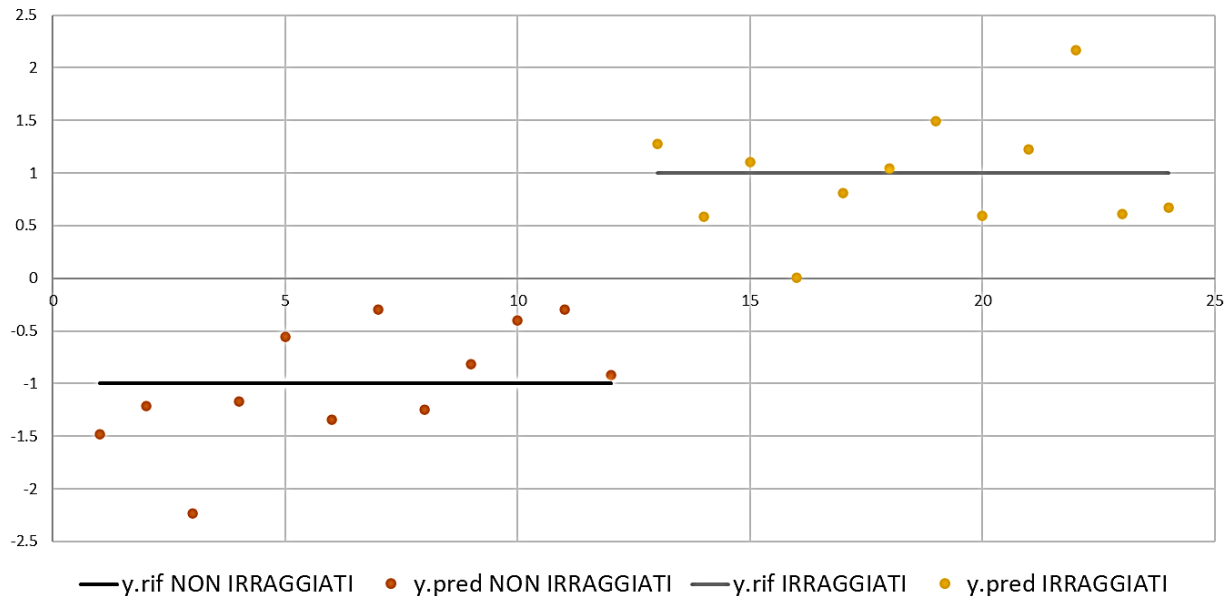
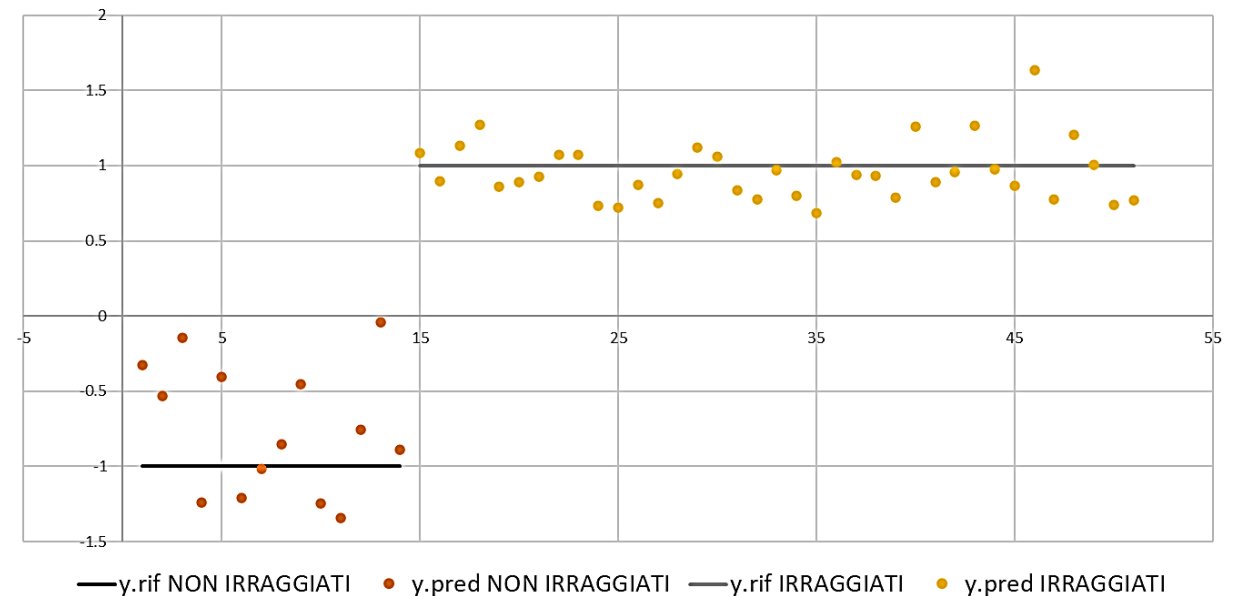


GRAFICO DISCRIMINANTE (ACQUISIZIONE IN NEGATIVO)



CONCLUSIONI

- ❖ In questo studio è stato analizzato il profilo LIPIDICO UNTARGETED del formaggio Camembert non irradiato e trattato con raggi X a tre diversi livelli di dose: 1.0, 2.0, 3.0 kGy
- ❖ Le analisi sono state eseguite mediante UHPLC-Q-Orbitrap e i dati sono stati processati con il software LIPIDSEARCH
- ❖ Sono stati identificate 20 sottoclassi di lipidi:
 - ❑ BisMePA, ChE, Pet, DG, DG Ox, TG e TG Ox (POSITIVO)
 - ❑ Cer, Cer Ox, Hex Cer, Hex Cer Ox, LPC, LPE, MGDG, PA, PC, PE, PI, PS e SM (NEGATIVO)
- ❖ **Sono state individuate differenze sui profili lipidici tra campioni irradiati a tre livelli di dose e campioni non irradiati**

Grazie!

**A VOI TUTTI PER
L'ATTENZIONE**

***Dott.ssa Valeria Nardelli
Dott. Marco Iammarino
Dott. Andrea Chiappinelli
Dott. Michele Tomaiuolo
Dott.ssa Rosalia Zianni***