GR2018-12367064

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

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

DESTINATARIO ISTITUZIONALE: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO DELLA PUGLIA E DELLA BASILICATA (IZSPB)
Principal Investigator: Dott.ssa Annalisa Mentana
CoPI: Dott Oto Miedico
Responsabile scientifico: Dott. Antonio Parisi
Dirigente responsabile: Dott.ssa Valeria Nardelli
Ricercatrice: Dott.ssa Maria Campaniello
UNITA' OPERATIVA UO2: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FOGGIA (UNIFG)
Responsabile UO2: Dott.ssa Rosalia Zianni

Progetto Giovani Ricercatori under 40 – finanziato dal Ministero della Salute

Il valore nutrizionale dei prodotti lattiero caseari è storicamente riconosciuto come parte integrante ed essenziale di una dieta equilibrata. I latticini sono fonti di macronutrienti (proteine di qualità, carboidrati e lipidi) e di acqua ma anche di minerali come calcio, magnesio, selenio e di nutrienti-chiave come riboflavina, vitamina B12 e acido pantotenico. Tuttavia, la contaminazione da parte di muffe, microrganismi e parassiti, non solo causa notevoli perdite economiche ma anche la potenziale produzione di metaboliti cancerogeni e tossici. La crescente attenzione dei consumatori verso questi prodotti, in particolare verso i formaggi a pasta molle, con caratteristiche organolettiche e benefici salutistici desiderati, spinge a considerare tecnologie alternative per l'inattivazione dei microrganismi, senza utilizzare il riscaldamento diretto. Tra le tecnologie non-termiche, suscita grande interesse l'irraggiamento che, a differenza delle classiche tecniche termiche, quali la pastorizzazione e la sterilizzazione ed altre tecnologie emergenti come l'alta pressione idrostatica, i campi elettrici pulsati, gli ultrasuoni e il plasma freddo, distrugge il DNA del microrganismo, producendo un effetto dannoso e permanente su quest'ultimo.

Attualmente più di 50 Paesi hanno dato l'approvazione per oltre 60 prodotti alimentari da irradiare per il consumo locale e/o per l'esportazione e circa 40 Paesi stanno utilizzando la tecnologia di irraggiamento alimentare. A livello europeo, come stabilito dalla Normativa (Direttive comunitarie 1999/2/CE e 1999/3/CE), tale tecnologia può essere utilizzata solo su determinati alimenti in presenza di un ragionevole bisogno tecnologico ed in assenza di rischi per la salute dei consumatori. A causa della mancanza di dati nel settore lattiero-caseario, in Europa, l'applicazione generale dei raggi X sui prodotti lattiero caseari è limitata ad un solo formaggio, il Camembert, e ad una dose massima di 2.5

kGy (Scientific Opinion EFSA, 2011) anche se altri prodotti caseari, quali i formaggi a pasta molle, potrebbero essere inclusi nelle autorizzazioni nazionali.

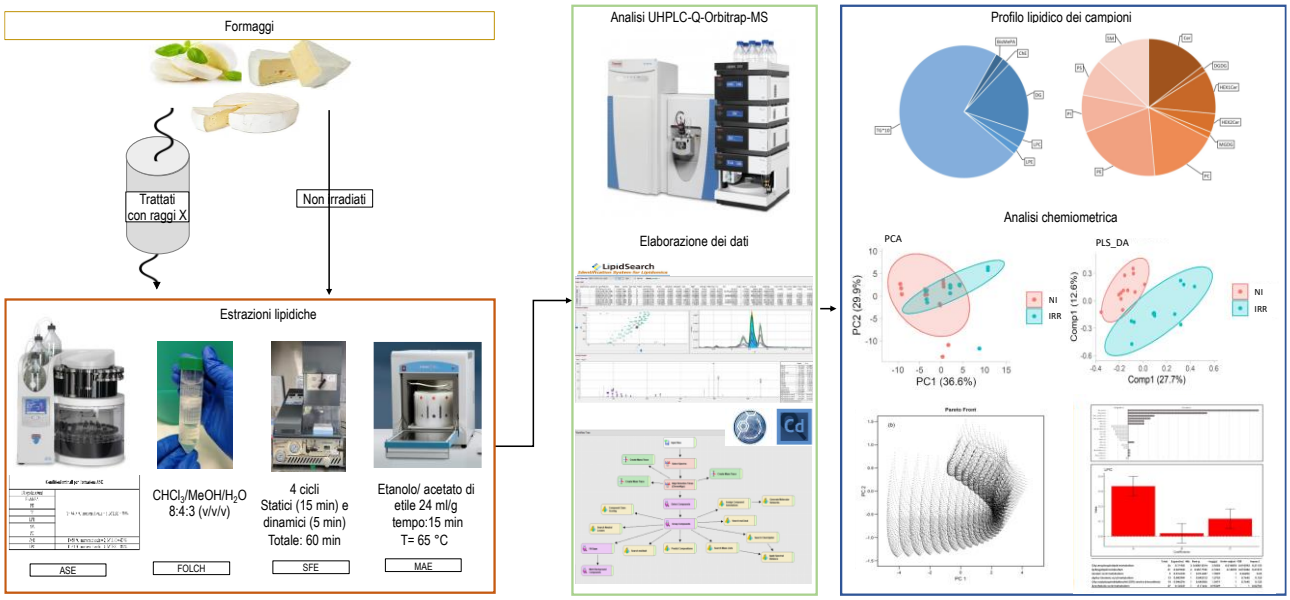
In questo contesto, il Progetto di Ricerca Finalizzata, GR-2018 cod.12367064 dal titolo "New Strategies for the evaluation of safety and quality of X-ray irradiated soft dairy products", finanziato dal Ministero della Salute, si è prefissato l'obiettivo di fornire informazioni sulla qualità e sulla sicurezza dei formaggi a pasta molle irradiati mediante raggi X a diverse dosi di trattamento. Il Progetto ha avuto inizio nel Dicembre 2020 terminando ad Aprile 2024. La ricerca è stata coordinata e realizzata dal Principal Investigator, la Dott.ssa Annalisa Mentana coadiuvata dal CoPI Dott. Oto Miedico, dalla Dott.ssa Maria Campaniello e dal gruppo di ricerca della struttura di Chimica, sotto la supervisione della Dott.ssa Valeria Nardelli, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata in qualità di Destinatario Istituzionale del Progetto, diretto dal Direttore Sanitario Dott. Antonio Parisi e dal Direttore Generale Dott. Antonio Fasanella. Il Progetto ha inoltre previsto una collaborazione con il gruppo di ricerca del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Foggia, come seconda Unità Operativa, guidata dal Responsabile Scientifico, la Dott.ssa Rosalia Zianni. In questo Progetto sono state impiegate tecniche e metodologie analitiche avanzate che utilizzano principalmente la cromatografia associata alla spettrometria ad alta risoluzione. È stato quindi possibile seguire approcci "-*omici untargeted*" per ottenere l'analisi completa ed efficace dei profili proteici, lipidici e volatili fornendo così informazioni importanti per una comprensione "olistica" dei fenomeni che avvengono all'interno di sistemi complessi, come le matrici alimentari oggetto di questo studio, quando perturbati da un fenomeno esterno, quale è il trattamento tecnologico dell'irraggiamento, e su eventuali fenomeni biologici indotti dallo stesso.

I risultati ottenuti non hanno evidenziato la sintesi di nuovi lipidi dovuti all'irraggiamento, confermando la sicurezza del trattamento radiante rispetto alla componente lipidica. D'altra parte si sono riscontrate differenze relative alle abbondanze delle diverse sottoclassi lipidiche dipendentemente dalla matrice analizzata suggerendo come i lipidi, soprattutto i trigliceridi e i fosfolipidi, a seguito dell'irraggiamento, possano essere coinvolti in diverse reazioni come ossidazione o rottura dei legami. Queste modifiche hanno consentito la discriminazione dell'alimento sottoposto ad irraggiamento mediante la formulazione di modelli matematici. Il profilo proteico alle dosi considerate, non ha presentato modifiche peptidiche come ossidazioni o deammidazioni, tuttavia, come per i lipidi, anche per le proteine, l'effetto dell'irraggiamento è legato al tipo di matrice analizzata ma, in generale le strutture secondarie delle proteine α-S1- e alla β-caseina hanno mostrato una maggiore suscettibilità al trattamento anche in dipendenza della dose assorbita. Infine, lo studio condotto sul profilo aromatico ha evidenziato delle modifiche dipendenti dalla dose impartita ma

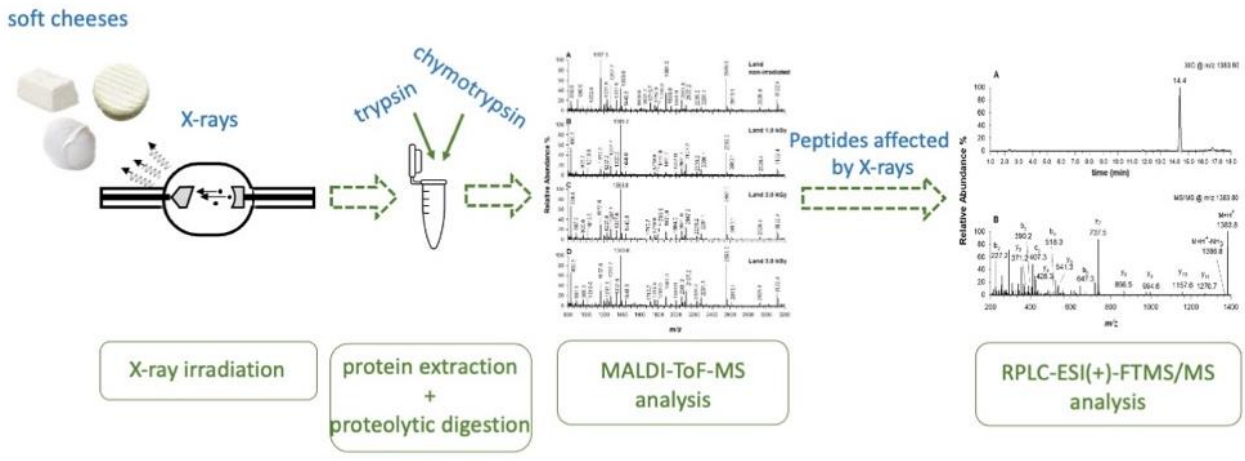
anche una stabilità nel tempo anche a distanza di alcuni mesi dal trattamento radiante. Inoltre è importante sottolineare come le molecole prodotte dopo il trattamento siano tutti composti noti e appartenenti a classi specifiche che sono comunque presenti nel fingerprint dei formaggi e quindi non compromettono la sicurezza dell'alimento.

In questi anni di attività scientifica, grazie al finanziamento ottenuto, sono stati sviluppati dei *workflow* analitici che comprendono il disegno sperimentale delle prove analitiche, l'ottenimento di modelli discriminanti, l'individuazione di nuove potenziali molecole di trattamento e l'analisi dei network molecolari annessi.

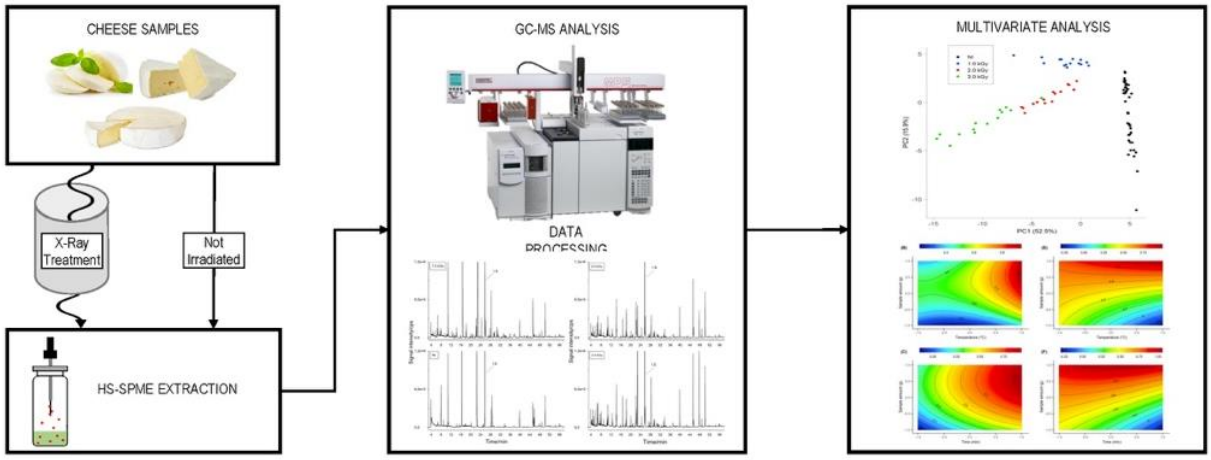
Gli obiettivi futuri riguarderanno un'analisi metabolomica, intesa come studio di piccole molecole/aggregati, per un ulteriore contributo alla comprensione dei fenomeni legati all'irraggiamento e l'applicazione di questi approcci ad altre matrici alimentari complesse.



Graphical abstract del workflow analitico per l'ottenimento del fingerprint lipidico dei formaggi a pasta molle analizzati



Graphical abstract del workflow messo a punto per l'ottenimento del fingerprint proteico dei formaggi anpasta molle analizzati.



Graphical abstract del workflow messo a punto per l'ottenimento del fingerprint aromatico dei formaggi analizzati

Di seguito i principali prodotti della Ricerca:

Partecipazioni a Convegni e Corsi

2024, Ottobre - Foggia, Italia - CORSO ECM (4 crediti). Sicurezza e Qualità dei formaggi trattati con radiazioni ionizzanti. Risultati ottenuti nel Progetto GR-2018 12367064.

2024, 26-30 agosto, Milano, Italia – XXVIII National Congress of Società Chimica Italiana-– Convegno nazionale della Società Chimica Italiana

A. Mentana, C. D. Calvano, R. Zianni, M. Campaniello, E. C.L. Rigante, T. R.I. Cataldi, A. Parisi, V. Nardelli. "Integrated omics approaches for comprehensive study of X-ray irradiated soft cheeses" (Comunicazione orale)

M. Campaniello, R. Zianni, M. Tomaiuolo, M. Iammarino, O. Miedico, V. Nardelli, A. Parisi, A. Mentana. "Accelerated solvent extraction/UHPLC-Q-Orbitrap-MS-based lipidomic workflow for comprehensive study of lipids in X-ray irradiated Camembert from raw cow's milk" (Poster)

2024, 17-18 giugno, Corso di formazione: Ricerca e territorio – *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata*

Mentana A., Zianni R. "GR2018-12367064 - "*New Strategies for the Evaluation of Safety and Quality of X-ray Irradiated Soft Dairy Products".* (Comunicazione orale)

2024, 26 marzo - Foggia, Italia - CORSO ECM (4 crediti). La scienza guidata dalle omiche: attuali conoscenze sugli approcci omici e loro applicazioni nella sicurezza e tracciabilità alimentare

Estrazione della componente lipidica dei formaggi mediante tecniche innovative – Dott.ssa Maria Campaniello

Tecniche cromatografiche: Principi ed applicazioni nell'ambito della sicurezza alimentare - Dott.ssa Rosalia Zianni

Volatolomica: studio e classificazione del profilo volatile - Dott.ssa Rosalia Zianni

Approcci omici e chemiometrici per lo studio dei formaggi a crosta fiorita trattati con radiazioni ionizzanti – Dott.ssa Mentana

2023, 18-19 dicembre, Bari, Italia – Chimica Sotto l'Albero – Convegno nazionale della Società Chimica Italiana (SCI Giovani e SCI Puglia)

Campaniello M., Nardelli V., Accettulli A.M., Zianni R., Tomaiuolo M., Miedico O., Iammarino M., Mentana M. "MAE/UHPLC-Q-Orbitrap-MS based lipidomic workflow and metabolomic analysis for comprehensive study of lipids in soft-cheeses" (Poster)

2023, 22 Novembre, Roma, Italia – Terzo Workshop LNR alimenti irradiati organizzato dall'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (Dipartimento di Sicurezza alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Servizio Grandi Strumentazioni e Core facilities); ISTITUTO ZOOPROFILATTICO DI PUGLIA E BASILICATA (Struttura complessa di chimica), MINISTERO DELLA SALUTE (Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione)

Zianni R. "Nuovi approcci omici per la valutazione della sicurezza alimentare dei prodotti lattiero-caseari irradiati" - (Comunicazione orale)

2023, 9 Novembre, Foggia, Italia - La scienza guidata dalle omiche: attuali conoscenze sugli approcci omici e loro applicazione nella sicurezza e tracciabilità alimentare.

Zianni R. "Volatolomica". (Comunicazione orale)

Zianni R. "Caratterizzazione del profilo volatile dei formaggi trattati con radiazioni ionizzanti". (Comunicazione orale)

2023, 17-21 settembre, Vasto (CH), Italia – Analitica 2023 – XXX Congresso della Divisione di Chimica Analitica (Società Chimica Italiana)

Campaniello M., Mentana A., Zianni R., Tomaiuolo M., Chiappinelli A., Iammarino M., Nardelli V. "Lipidomics and metabolomic tools for the characterization of Camembert cheese analysed by UHPLC-Q-Orbitrap-MS". (Poster)

2023, 13-15 settembre, Praga, Repubblica Ceca – CHEMICAL REACTIONS IN FOODS IX – 9th International conference

Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Nardelli V., Iammarino M., Zianni R. "Characterization and discrimination of irradiated Camembert cheese by UHPLC-Q-Orbitrap-MS lipidomics and chemometric analysis". (Poster)

2023, 13-15 settembre, Pizzo (VV) Congresso Nazionale dei Medici Veterinari Igienisti XXXII Congresso AIVI XXXII

Campaniello M., Mentana A., Tomaiuolo M., Chiappinelli A., Iammarino M., Nardelli V., Zianni R. "Nuovi approcci per la valutazione qualitativa dei prodotti lattiero-caseari: spettrometria di massa ad alta risoluzione, analisi lipidomica e metabolomica" – (Comunicazione orale)

2023, 28-30 giugno, Torino, Italia – Massa 2023 – Congresso Nazionale di Spettrometria di Massa della Divisione di Spettrometria di Massa (Società Chimica Italiana)

Zianni R., Tomaiuolo M., Campaniello M., Mentana A., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. "The effect of X-ray irradiation on volatile profile of Robiola cheese". (Comunicazione orale)

Campaniello M., Mentana A., Tomaiuolo M., O. Miedico, Chiappinelli A., Zianni R., Iammarino M., Nardelli V. "LC-ORBITRAP-HRMS Lipidomic analysis and metabolomic investigation for characterization of polar lipids in Mozzarella cheese". (Poster)

2023, 25-26 maggio, Bari, Italia – 11th MS – Jday – Convegno nazionale della Divisione di Spettrometria di Massa (Società Chimica Italiana)

Chiappinelli A., Campaniello M., Zianni R., Tomaiuolo M., Mentana A., Nardelli V., Iammarino M. "Determination of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone as markers in X-ray irradiated dairy products by HS-SPME/GC-MS analysis". (Comunicazione orale)

2022, 19-20 dicembre, Bari, Italia – Chimica Sotto l'Albero – Convegno nazionale della Società Chimica Italiana (SCI Giovani e SCI Puglia) – 3 contributi

Zianni R., Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. "The effect of low-energy X-ray irradiation on volatile profile of soft-cheeses". (Comunicazione orale)

Mentana A., Campaniello M., Zianni R., Tomaiuolo M., Miedico O., Chiappinelli A., Nardelli V., Iammarino M. "Microwave-Assisted Extraction as environmentally friendly technique in lipidomics: the case of mozzarella cheese". (Comunicazione orale flash)

Campaniello M., Mentana A., Zianni R., Iammarino M., Nardelli V. "Supercritical Fluid Extraction for lipidomic approach: advantages and limitations". (Comunicazione orale flash)

2022, 7-9 novembre, Dubrovnik, Croazia – 6 IMEKO FOODS - IMEKO TC 23 "Metrology in Foods and Nutrition" and EUROLAB (Hybrid conference)

Zianni R., Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. "Chemometric discrimination of X-ray irradiated mozzarella cheese based on the volatile profile by HS-SPME/GC-MS". (Comunicazione orale)

2022, 22-24 settembre, Teramo - XXXI Convegno Nazionale A.I.V.I.

Campaniello M., Mentana A., Zianni R., Tomaiuolo M., Iammarino M., Nardelli V. "SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE APPLICATA ALL'ANALISI LIPIDOMICA DEL FORMAGGIO CAMEMBERT TRATTATO CON RAGGI-X". (Poster; *Premiato come miglior poster*)

2022, 5-7 ottobre, Firenze – 7 MS Food Day – Divisione di Spettrometria di Massa della Società Chimica Italiana – 2 contributi

Zianni R., Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. "HS-SPME/GC–MS and chemometric approach for the study of volatile profile in X-ray irradiated mozzarella cheese". (Poster)

Mentana A, Campaniello M., Zianni R, Tomaiuolo M., Miedico O., Iammarino M., Nardelli V. "Comparison of three extraction techniques for lipid profile characterization of mozzarella cheese by UHPLC-Q-Orbitrap-MS". (Poster)

2022, 11-15 settembre, Castello di Milazzo (ME) – XXIX Congresso della Divisione di Chimica Analitica (Società Chimica Italiana) – 3 contributi

Zianni R., Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Iammarino M., Centonze D., Palermo C. "Effect of X-ray irradiation treatment on volatile organic compounds (VOCs) of mozzarella cheese". (Poster)

Mentana A., Campaniello M, Zianni R., Tomaiuolo M., Iammarino M., Nardelli V.
"Untargeted lipidomics to evaluate the effects of x-ray treatment on mozzarella cheese". (Comunicazione orale)

Mentana A., Campaniello M, Zianni R., Tomaiuolo M., Nardelli V, Iammarino M.
"Efficient lipid profile characterization of mozzarella cheese by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry". (Poster)

2022, 26 Maggio, Roma, Italia – Secondo Workshop LNR alimenti irradiati organizzato dall'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (Dipartimento di Sicurezza alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Servizio Grandi Strumentazioni e Core facilities); ISTITUTO ZOOPROFILATTICO DI PUGLIA E BASILICATA (Struttura complessa di chimica), MINISTERO DELLA SALUTE (Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione)

Mentana A. e Campaniello M. "Approccio untargeted per lo studio del profilo lipidico del formaggio Camembert irradiato con raggi X" - (Comunicazione orale, modalità online)

2021, 20 dicembre, Bari, Italia – Chimica Sotto l'Albero – Società Chimica Italiana, sezione Puglia

Mentana A., Zianni R., Campaniello M., Chiappinelli A., Tomaiuolo M., Nardelli V. "Comparison of two extraction methods for lipidomic profile of mozzarella cheese by ultra-high liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry". (Comunicazione orale)

2021, 25-26 novembre, edizione online – SIDILV

Mentana A., Zianni R., Campaniello M., Chiappinelli A., Tomaiuolo M., Nardelli V. "studio dei prodotti lattiero-caseari trattati con radiazioni ionizzanti mediante analisi HS-SPME-GC-MS dei 2-alchilciclobutanoni". (Poster)

2021, 14-23 settembre 2021, edizione online – XXVII CONGRESSO NAZIONALE Società Chimica Italiana – 3 contributi

Zianni R., Mentana A., Campaniello M., Tomaiuolo M., Nardelli V. "Lipidomic approach to evaluate the effect of X-ray irradiation treatment on the lipid profile of Camembert cheese". (Comunicazione orale)

Mentana A., Zianni R., Campaniello M., Chiappinelli A., Nardelli V. "Efficient lipid profile characterization of mozzarella cheese by Optimizing Accelerated Solvent Extraction combined with Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry". (Poster)

Palermo C., Mentana A., Zianni R., Croce L., Centonze D. "Volatolomics study of X-ray irradiated dairy products by HS-SPME/GC-MS". (Poster)

2021, 24 giugno, 2nd edizione online – 9th MS-J-Day, I giovani e la spettrometria di massa 2021 (Società Chimica Italiana)

Zianni R., Mentana. A, Campaniello M., Nardelli V. "Supercritical fluid extraction with Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry for lipidomic analysis of mozzarella cheese". (Comunicazione orale)

2021, 23 giugno, Corso di formazione: Ricerca e territorio – *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata*

Mentana A., Zianni R. "GR2018-12367064 - "*New Strategies for the Evaluation of Safety and Quality of X-ray Irradiated Soft Dairy Products".* (Comunicazione orale)

2021, 16 giugno, Corso di formazione: Ricerca e territorio – *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata*

Mentana A., Zianni R. "GR2018-12367064 - "*New Strategies for the Evaluation of Safety and Quality of X-ray Irradiated Soft Dairy Products".* (Comunicazione orale)

Elenco principali pubblicazioni su riviste indicizzate

- M. Campaniello, V. Nardelli, R. Zianni, M. Tomaiuolo, O. Miedico, M. Iammarino, A. Mentana. Microwave-Assisted Extraction/UHPLC-Q-Orbitrap-MS-Based Lipidomic Workflow for Comprehensive Study of Lipids in Soft Cheese. Foods 13(7), 1033, 2024. https://doi.org/10.3390/foods13071033

- C. Palermo, A. Mentana, M. Tomaiuolo, M. Campaniello, M. Iammarino, D. Centonze, R. Zianni. Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Chemometric Approach for the Study of Volatile Profile in X-ray Irradiated Surface-Ripened Cheeses. Foods, 13(3):416, 2024 https://doi.org/10.3390/foods13030416

- E.C.L. Rigante, C.D. Calvano, G. Ventura, R. Zianni, M. Campaniello, V. Nardelli, A. Mentana*, T. R.I. Cataldi. Bottom-up proteomics to investigate the X-ray irradiation effects on soft cheese. LWT – Food Sciences and technology 191, 115643, 2024. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115643

- M. Tomaiuolo, V. Nardelli, A. Mentana, M. Campaniello, R. Zianni, Iammarino M. Untargeted lipidomics and chemometric tools for the characterization and discrimination of irradiated Camembert cheese analysed by UHPLC-Q-Orbitrap-MS. Foods 12(11), 2198, 2023. https://doi.org/10.3390/foods12112198

- R. Zianni, A. Mentana, M. Tomaiuolo, M. Campaniello, M. Iammarino, Volatolomic approach by HS-SPME/GC-MS and chemometric evaluations for the discrimination of X-ray irradiated mozzarella cheese. Food Chemistry, 423, 136239, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136239

- A. Mentana, R. Zianni, M. Campaniello, M. Tomaiuolo, A. Chiappinelli, M. Iammarino, V. Nardelli. Optimizing accelerated solvent extraction combined with liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry for efficient lipid profile characterization of mozzarella cheese. Food Chemistry 394, 133542, 2022. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133542

- R. Zianni, A. Mentana, M. Campaniello, A. Chiappinelli, M. Tomaiuolo, E.A. Chiaravalle, G. Marchesani. An investigation using a validated method based on HS-SPME-GC-MS detection for the determination of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone in X-ray irradiated dairy products. LWT - Food Science and Technology 153, 112466, 2022. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112466