



SCIENZE OMICHE PER L'AUTENTICITÀ DELLE CARNI BIO

Si può verificare l'autenticità di una carne biologica? Le scienze omiche si propongono di colmare il gap analitico in questo campo. Analizzando il proteoma delle carni è possibile individuare biomarcatori che ne distinguono il tipo di allevamento ed il genotipo, aprendo la strada a controlli più affidabili e strumenti predittivi per le aziende.

Perché servono nuove analisi per la carne biologica?

Negli ultimi anni il mercato dei prodotti biologici ha mostrato un trend in continua ascesa. Sostenuti da consumatori sempre più attenti alla sostenibilità, al benessere animale e alla trasparenza della filiera, i prodotti "bio" hanno registrato costanti aumenti nelle vendite sia sui mercati nazionali che su quelli internazionali, con i prodotti carnei tra i più distribuiti, in particolare le carni avicole (Fig. 1) [1, 2].

Per garantire il rispetto delle corrette pratiche di produzione, gli enti preposti effettuano controlli in ogni fase della filiera, dagli allevamenti ai mangimi-

fici, fino agli stabilimenti di trasformazione. Tuttavia, una volta che il prodotto arriva sul mercato, la tracciabilità rimane l'unico strumento a disposizione di intermediari e consumatori per verificarne l'effettiva "biologicità". Questo perché, ad oggi, manca uno strumento analitico capace di verificare se una carne commercializzata come "biologica" lo sia davvero. Infatti, analisi come la ricerca di residui di antibiotici, tradizionalmente utilizzate nei controlli ufficiali, non sono sufficienti: l'assenza di farmaci non è un criterio distintivo del biologico, poiché possono essere prodotte carni senza antibiotici anche in allevamento convenzionale, le cosiddette "antibiotic-free".

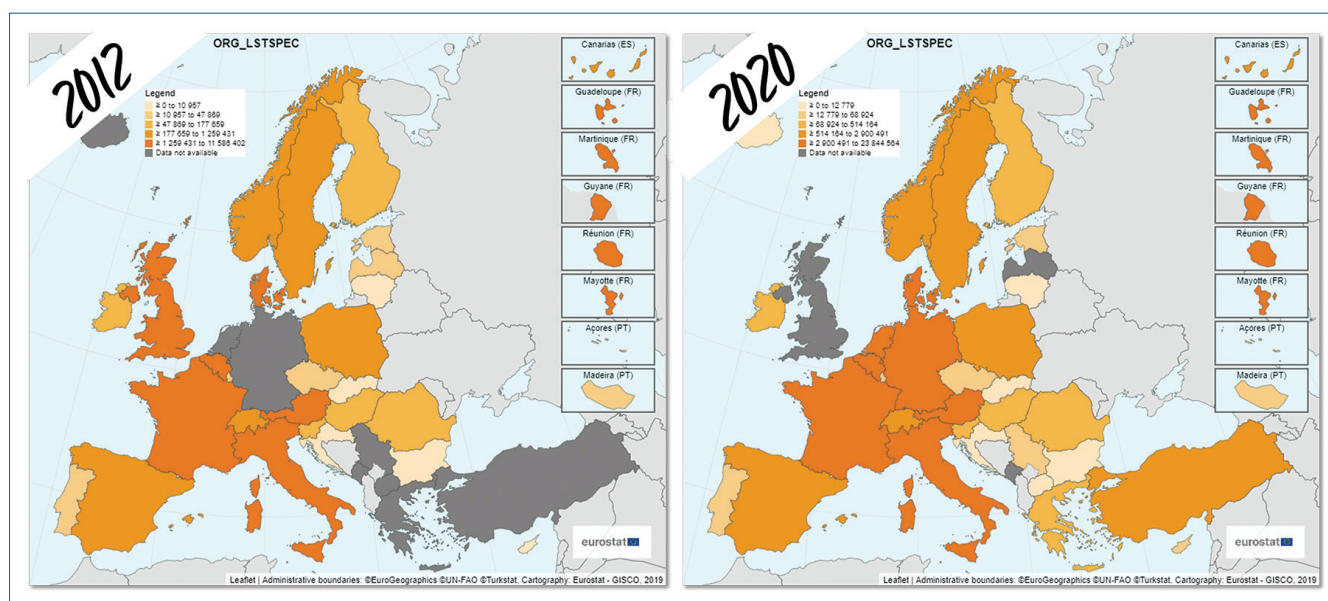


Fig. 1 - Distribuzione allevamenti biologici per carni avicole in Europa: confronto tra 2012 e 2020 (fonte EUROSTAT)

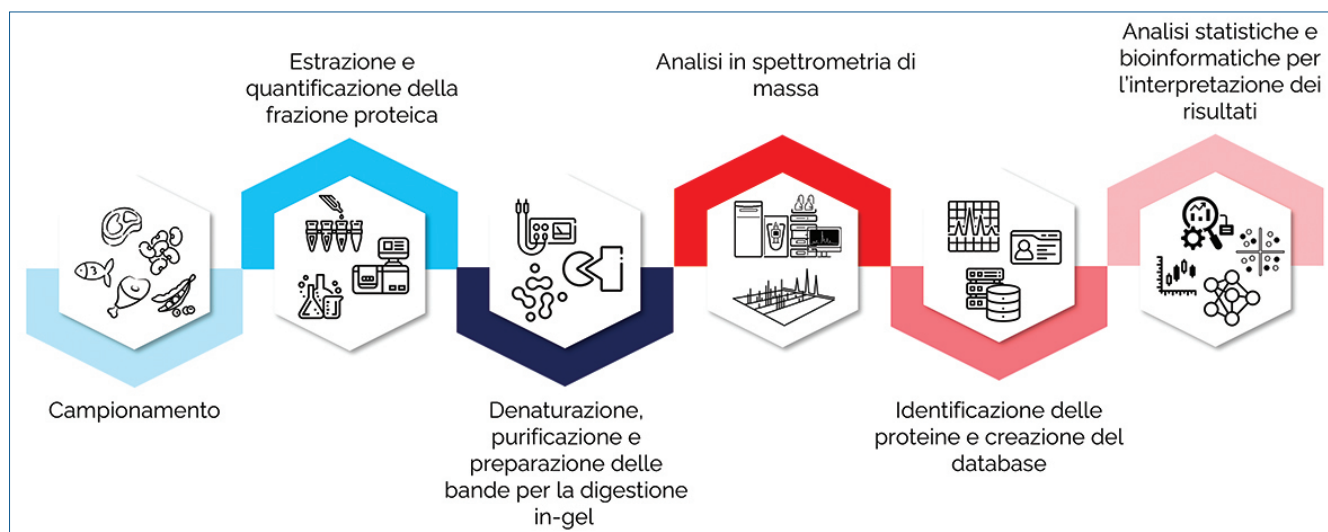


Fig. 2 - Rappresentazione schematica di un workflow generale per analisi proteomiche su matrici alimentari

Ma allora qual è la differenza tra una carne biologica ed una antibiotic-free?

La risposta è molto più complessa di quanto si pensi. “Biologico” è molto di più che la semplice assenza di tracce di antibiotici. Produrre carne biologica significa gestire l'intera vita dell'animale ed i successivi processi di trasformazione con criteri precisi definiti dalla normativa europea 2018/848 [3]. La scelta di specifiche linee genetiche, l'alimentazione certificata, gli spazi adeguati, il libero accesso all'aperto, i ritmi circadiani, i tempi di crescita più lunghi e il benessere animale sono solo alcuni dei parametri regolamentati. Tutte queste condizioni influenzano profondamente il metabolismo dell'animale e, di conseguenza, la composizione molecolare dei suoi tessuti, quindi la qualità della carne.

Nonostante gli sforzi normativi e la crescente domanda, l'autenticazione delle carni biologiche a livello analitico rappresenta un divario ancora da colmare in quanto i metodi analitici tradizionali non sono in grado di restituire informazioni sull'alimentazione, sulla storia o sullo stile di vita dell'animale. Serve dunque un approccio nuovo, più complesso, capace di integrare informazioni ambientali, nutrizionali, genetiche e persino comportamentali.

In questo contesto, niente può fornire questo tipo di informazioni dalle carni meglio delle proteine, o meglio, del proteoma. Le proteine, infatti, sono le unità funzionali che costituiscono il motore cellulare, mentre il proteoma è stato definito come l'insieme completo di proteine caratterizzate in base alle

loro localizzazioni, interazioni, modifiche post-traduzionali e *turnover* in un dato momento della vita della cellula e/o per una specifica condizione. Dunque il proteoma è lo specchio dello stato fisiologico della cellula, del tessuto o dell'organismo: risponde allo stress, al movimento, al tipo di alimentazione, alla temperatura, alla crescita. Se cambia l'allevamento, cambia il proteoma [4, 5].

Dal singolo composto alla visione d'insieme

Per decenni, la chimica in ambito alimentare ha lavorato alla ricerca di indicatori specifici: un residuo, un composto target, un gruppo di molecole. Questo approccio, pur fondamentale, soffre di un limite intrinseco: è mirato a ciò che già conosciamo. Purtroppo però, le frodi e le falsificazioni si evolvono più rapidamente dei metodi per scovarle, vista la complessità delle matrici in esame.

Dunque, per colmare questo *gap* servono strumenti nuovi e all'avanguardia. È qui che entra in gioco la grande famiglia delle scienze omiche: genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica. Attraverso queste metodiche, nate in ambito biomedico e ora sempre più presenti nella ricerca nutraceutico-alimentare, è diventato possibile identificare e quantificare migliaia di molecole contemporaneamente e studiare *pattern*, biomarcatori e relazioni metaboliche che non sono evidenti con approcci tradizionali. Nel caso specifico delle carni, assume fondamentale importanza soprattutto la proteomica [4, 5]. Questo approccio, infatti, permette l'analisi dell'intero proteoma di una cellula o di un tes-

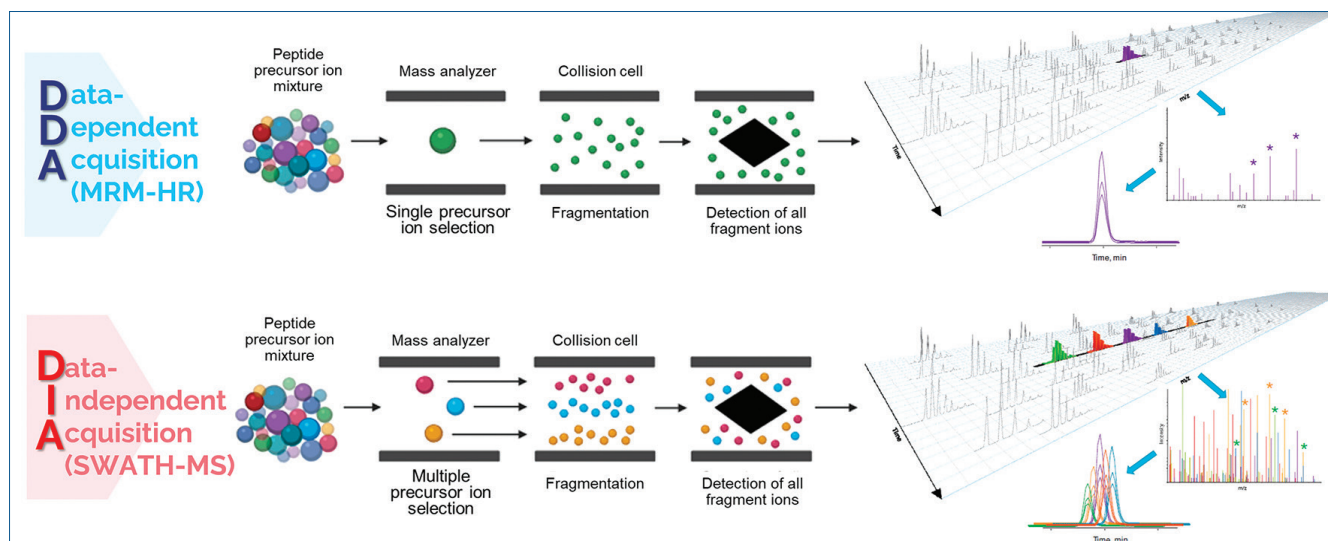


Fig. 3 - Confronto tra metodi di quantificazione basati sulla spettrometria di massa: rappresentazione schematica del metodo di acquisizione DDA mediante MRM ad alta risoluzione e dell'acquisizione DIA mediante la tecnica SWATH-MS [10]

suto, restituendo un vero “ritratto” della matrice in analisi come risultato del suo stato attuale e della sua storia. Il risultato è una mole di dati che, opportunamente integrata, può consentire di distinguere la carne biologica da quella convenzionale, andando molto oltre le analisi di routine.

I workflow delle analisi proteomiche si sviluppano principalmente in tre fasi: estrazione e separazione delle proteine dal tessuto per ridurre la complessità del campione, identificazione e quantificazione mediante spettrometria di massa, analisi dei dati con integrazioni statistiche e bioinformatiche (Fig. 2). Tutto ciò è possibile grazie agli avanzamenti tecnologici degli ultimi anni nel campo della spettrometria di massa. I nuovi strumenti ad alta risoluzione permettono un'accuratezza del dato m/z tale da poter ricorrere all'utilizzo delle banche dati per l'identificazione delle molecole [6].

Il caso studio: il proteoma come discriminante tra carni avicole biologiche e antibiotic-free

Il lavoro di ricerca, sviluppato dal gruppo di Chimica degli Alimenti dell'Università di Camerino in partnership con l'azienda Fileni, leader italiano per la produzione di carni avicole biologiche, e in collaborazione con il Dr. Mohammed Gagaoua, esperto ricercatore in qualità dei prodotti e delle filiere della carne afferente al Teagasc - Agriculture and Food Development Authority (Dublino, Irlanda), è stato condotto con approcci complementari.

Un totale di 40 campioni di muscolo *Pectoralis major*, alle stesse condizioni post-mortem, sono stati forniti dall'azienda. Tutte le analisi sono state svolte tenendo in considerazione due sistemi di allevamento (biologico e antibiotic-free indoor) e due linee genetiche di pollo (Ross 308 - a rapida crescita e più comunemente usato per la produzione di carne - e Ranger Classic - genotipo ibrido a crescita più lenta). Inizialmente le differenze di espressione proteica sono state messe in luce mediante approccio tradizionale con elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) e successiva identificazione dei singoli spot proteici in spettrometria di massa (MS/MS) [6]. In questa prima analisi sono emerse interessanti differenze dovute sia alle disparità genetiche dei polli che ai diversi metodi di allevamento.

Sulla scia dei risultati ottenuti, gli studi successivi hanno utilizzato la proteomica “shotgun”, integrata con strumenti bioinformatici, per approfondire i meccanismi biologici alla base delle differenze proteiche nella carne di pollo, in relazione sia al sistema di allevamento sia al genotipo.

Il protocollo “shotgun” è una tecnica di preparazione del campione che si compone di diversi passaggi: estrazione, denaturazione e concentrazione delle proteine su gel SDS-PAGE, seguite da digestione in-gel con tripsina. I peptidi digeriti sono stati quindi separati mediante nanoLC e analizzati in uno spettrometro di massa high-speed Triple TOF 6600 (SCIEX, Foster City, CA) in modalità Data Independent Ac-



quisition (DIA) SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) [7, 8].

Il principio di base della SWATH-MS è la divisione del range di m/z in una serie di intervalli a 25 Da, in modo da ottenere informazioni su tutti i frammenti ionici all'interno dell'intervallo di scansione ad altissima velocità. In breve, Q1 seleziona gli ioni, Q2 funge da camera di collisione per indurre la reazione di frammentazione, e gli ioni frammentati sono infine analizzati nel TOF [9].

Ciò si traduce in una co-frammentazione di ioni eluiti simultaneamente e genera spettri MS/MS altamente complessi, che devono essere deconvolti mediante approcci specifici di analisi dei dati (Fig. 3). Viene quindi utilizzata una libreria di spettri ionici per estrarre cromatogrammi in modo mirato e identificarli in base alle loro frammentazioni grazie ad un'accuratezza fino alla quinta cifra decimale del valore di m/z .

Vista la scarsità di studi sull'argomento, per questo lavoro, la libreria è stata costruita appositamente

in-house analizzando quattro soluzioni peptidiche (pool samples dei 4 gruppi) mediante Data-Dependent Acquisition (DDA) che prevede l'acquisizione in MS scan con intervallo 400-1250 m/z , seguita da una scansione MS/MS da 100 a 1500 m/z dei 65 ioni precursori più abbondanti, per un tempo di ciclo totale di 2,8 s. L'estrazione dei picchi è stata condotta utilizzando il componente aggiuntivo per il software PeakView (versione 2.2, Sciex, Redwood City, CA, USA) e MS/MS con SWATH Acquisition Micro-App (versione 2.0, Sciex, Redwood City, CA, USA). Solo i peptidi con un punteggio di confidenza superiore al 99% (match con il database Protein Pilot) sono stati inclusi nella libreria spettrale.

Dopo la creazione della libreria, i 40 campioni sono stati

iniettati singolarmente in modalità Data-Independent Acquisition (DIA). I dati sono stati elaborati utilizzando il software ProteinPilotTM 5.0.1 di Sciex che utilizza l'algoritmo ParagonTM per la ricerca nel database e ProgroupTM per il raggruppamento dei dati. Successivamente le proteine identificate sono state confrontate con il database Uniprot specifico la specie *Gallus gallus*.

Sono state identificate più di 600 proteine nei 4 gruppi di campioni analizzati. Un primo screening per il riconoscimento di potenziali biomarcatori mediante metodi chemiometrici di discriminazione tra i gruppi ha rivelato che ogni gruppo è caratterizzato da un profilo proteico distintivo, riconoscibile da algoritmi come la Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA) (Fig. 4A).

I dati hanno mostrato interessanti somiglianze nel proteoma delle carni biologiche, seppur di diverso genotipo, con differenze significative rispetto al proteoma dei campioni antibiotic-free, rivelando che l'allevamento biologico può influenzare il proteoma

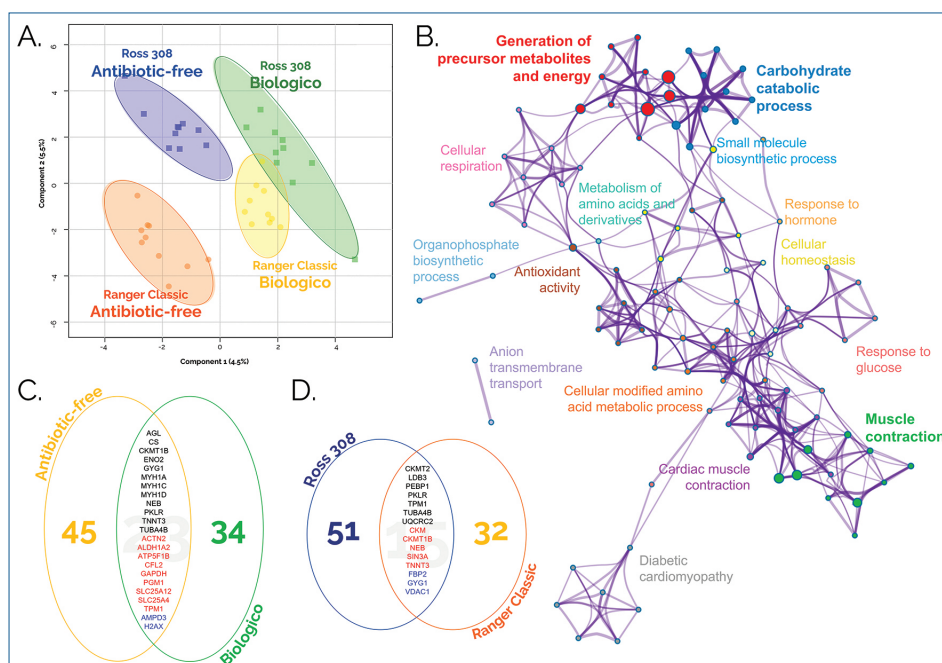


Fig. 4 - A) Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) score plot relativo alla distribuzione dei 4 gruppi di campioni sulla base del proteoma analizzato; B) network layout basato sull'analisi bioinformatica dei pathways (Gene Ontology, KEGG, Reactome) delle proteine con VIP (Variable Importance in Projection) score >1. Ogni termine è rappresentato da un nodo la cui dimensione è proporzionale al numero di proteine che vi rientrano, e il colore rappresenta l'identità del cluster; C-D) diagrammi di Venn relativi alla sovrapposizione e al numero di proteine identificate come differenzialmente espresse in ogni gruppo. In rosso i gene names delle proteine sovra-esprese e in blu quelle sotto-esprese nei campioni Ranger Classic rispetto ai Ross 308 (C) e nei campioni biologici rispetto a quelli antibiotic-free (D)

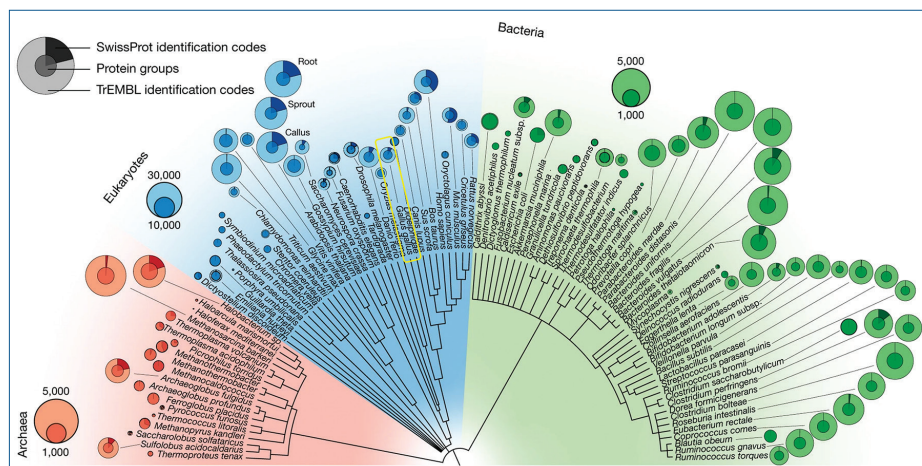


Fig. 5 - Panoramica sui database proteomici degli organismi ordinati e classificati in base alla tassonomia del National Center for Biotechnology Information (NCBI). I grafici a torta si riferiscono al numero di gruppi proteici (proteine distinguibili dai loro peptidi identificati) e alle voci proteiche revisionate e non revisionate di ciascun database [11]

muscolare in misura maggiore rispetto al sistema convenzionale indoor senza antibiotici. Sovra- o sotto-espressioni di proteine afferenti a *pathways* specifici, secondo la letteratura scientifica attuale, sono riconducibili ad una maggiore probabilità di ottenere carne con caratteristiche qualitative diverse [7-9]. Trattati distintivi sono stati riscontrati nel proteoma delle carni antibiotic-free, soprattutto di genotipo Ross 308. Questo ha riportato sovra-espressione di proteine relative a pathways di accrescimento muscolare e struttura delle miofibrille piuttosto che a quelli del metabolismo dell'ATP o di generazione di energia e metaboliti precursori, più espressi negli altri gruppi di campioni (Fig. 4B).

Il confronto tra i genotipi Ross 308 e Ranger Classic ha evidenziato differenze significative nel proteoma muscolare, in parte dovute al background genetico ma, secondo i nostri risultati, influenzate anche dalle condizioni di allevamento. Nel complesso, il sistema di allevamento ha dimostrato avere un impatto significativo sul proteoma della carne di pollo, con possibili implicazioni sulle proprietà nutrizionali e sensoriali della carne, nonché sulla sicurezza alimentare. I risultati hanno individuato diversi potenziali biomarcatori proteici da approfondire e validare attraverso un'adeguata pipeline di discovery (Fig. 4C e 4D). In particolare, 9 proteine (in rosso nella Fig. 4C) sono emerse come possibili biomarcatori del ceppo Ranger Classic e 2 proteine (in blu nella Fig. 4C) di Ross 308, poiché risultavano significativamente sovrae-

sprese in ciascun genotipo, indipendentemente dal sistema di allevamento.

Allo stesso tempo, il dato più rilevante, in ottica industriale, è che si sono delineati set di proteine in grado di discriminare la carne biologica da quella non biologica, indipendentemente dalla linea genetica. In particolare, 5 proteine nei campioni biologici (in rosso nella Fig. 4D) e 3 negli antibiotic-free (in blu nella Fig. 4D) sono risultate significativamente sovra-regolate nelle carni di ciascun sistema di produzione, indipendentemente dal genotipo dell'animale.

Queste proteine potrebbero rappresentare dei veri e propri biomarcatori di autenticità, cioè parametri oggettivi, misurabili e riproducibili. Per raggiungere tale obiettivo, saranno comunque necessarie ulteriori indagini di conferma utilizzando approcci proteomici mirati come analisi targeted di quantificazione con standard analitici (Multiple Reaction Monitoring, MRM o Parallel Reaction Monitoring, PRM).

D'altra parte, questo studio ha rappresentato la prima applicazione della proteomica alle carni di pollo biologiche. Nel corso del lavoro è emersa però una sfida significativa, legata al numero ancora limitato di proteine confermate nel database UniProt per *Gallus gallus*. Infatti, su 51565 codici, soltanto circa il 5% sono stati revisionati (SwissProt), e ne è quindi stata confermata la struttura, la funzione e la qualità dell'annotazione, mentre la restante parte è formata da sequenziamenti predittivi automatici e non revisionati manualmente (TrEMBL) (Fig. 5). Questo sicuramente ha reso meno immediata l'identificazione proteica, soprattutto perché si tratta di analisi ad ampio spettro. Tuttavia, con l'aumentare degli studi in questo ambito, il database si amplierà, garantendo in futuro dati sempre più robusti e affidabili.

Ricerca e innovazione a servizio delle aziende

I risultati di questo studio suggeriscono prospettive molto interessanti per il settore avicolo, poiché mostrano come genetica e pratiche di allevamento influenzino profondamente la qualità della carne. La



scelta della linea genetica, ad esempio, può rappresentare un fattore strategico: secondo uno studio recente, i genotipi di pollo a crescita lenta, rappresentano il miglior compromesso nell'allevamento biologico, non solo nella qualità della carne ma anche dal punto di vista economico [12]. Capire come questi elementi si riflettano a livello molecolare permette di orientare in modo più consapevole le decisioni produttive.

Un altro aspetto di grande rilevanza riguarda la possibilità di individuare biomarcatori specifici della produzione biologica. Questi "segnali" molecolari potrebbero diventare strumenti utili per contrastare le frodi e per giustificare il maggior valore economico della carne biologica, offrendo ai consumatori una garanzia concreta sull'origine e sull'autenticità del prodotto acquistato. La ricerca in questo campo è ancora alle prime fasi, ma continuare ad ampliare le conoscenze consentirà, in futuro, di integrare questi approcci nei normali processi di controllo della qualità, rendendoli parte delle strategie aziendali di monitoraggio e certificazione.

Dunque l'applicazione delle scienze omiche non è solo un esercizio accademico: rappresenta un'opportunità concreta per le aziende del settore e può diventare una vera risorsa strategica in quanto consente di creare set di biomarcatori affidabili, ed utili lungo tutta la filiera, dal mangime al prodotto finito, migliorando trasparenza, sicurezza e tracciabilità e fornendo supporto alle certificazioni. L'integrazione con piattaforme digitali e sistemi di gestione dei dati potrà rafforzare ulteriormente questo valore, trasformando la narrazione del biologico in un'informazione oggettiva e verificabile sul prodotto finale. Nel lungo termine, l'unione di database di proteomica, metabolomica e genomica potrà aprire la strada a modelli capaci di rappresentare e simulare la realtà della matrice e anticipare le criticità. Questo sposterebbe i concetti di controllo qualità ed autenticità ad un livello predittivo diventando strumenti standard per garantire trasparenza e fiducia lungo tutta la filiera.

Nuovi metodi analitici verso un futuro sostenibile e consapevole

La sfida per la carne biologica è dunque scientifica, industriale e sociale. Le scienze omiche aprono prospettive innovative per identificare e certificare il valore aggiunto di questo prodotto, andando oltre

i limiti delle analisi tradizionali. L'investimento nella ricerca e nella sperimentazione di queste metodiche analitiche rappresenta una scelta di responsabilità verso il consumatore, in primis, e verso l'ambiente, evitando gli sprechi lavorando su modelli predittivi. Tutto ciò porterebbe allo sviluppo di prodotti animali autentici, tracciabili e sostenibili.

BIBLIOGRAFIA

- [1] European Commission - Agricultural and Rural Development, *Agricultural Market Brief*, 2023, **20**.
- [2] ISMEA Mercati, *Biologico - Ultime dal settore*, 2025.
- [3] European Commission, *Official Journal of the European Union*, 2018, **L 150**.
- [4] M. Gagaoua, W. Schilling *et al.*, *Encyclopedia of Meat Sciences*, 3rd Ed., Elsevier Ltd., Amsterdam, 2024, **3**, 513.
- [5] R. Pedreschi, M. Hertog *et al.*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 680.
- [6] L. Alessandroni, G. Sagratini, M. Gagaoua, *Food Chem. Mol. Sci.*, 2024, **8**, 100194.
- [7] L. Alessandroni, G. Sagratini *et al.*, *Curr. Res. Food Sci.*, 2024, **8**, 100757.
- [8] L. Alessandroni, G. Sagratini, M. Gagaoua, *J. Agric. Food Chem.*, 2024, **72**, 20153.
- [9] C. Ludwig, L. Gillet *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2018, **14**, e8126.
- [10] A.N. Neagu, M. Jayathirtha *et al.*, *Molecules*, 2022, **27**, 2411.
- [11] J.B. Müller, P.E. Geyer *et al.*, *Nature*, 2020, **582**, 592.
- [12] K. Obremski, J. Tyburski *et al.*, *Agriculture*, 2023, **14**, 10.

Omics Sciences for Organic Meat Authenticity

Can the authenticity of organic meat be verified? Omics sciences aim to fill the current analytical gap in this field. Analyzing meat proteomes allows the identification of biomarkers that can discriminate farming systems and genotypes, paving the way for more reliable controls and predictive tools for the industry.