

Autenticazione e Tracciabilità molecolare come strumenti per la valorizzazione dei formaggi irpini

Assunta Riccio
Biogem, Ariano Irpino

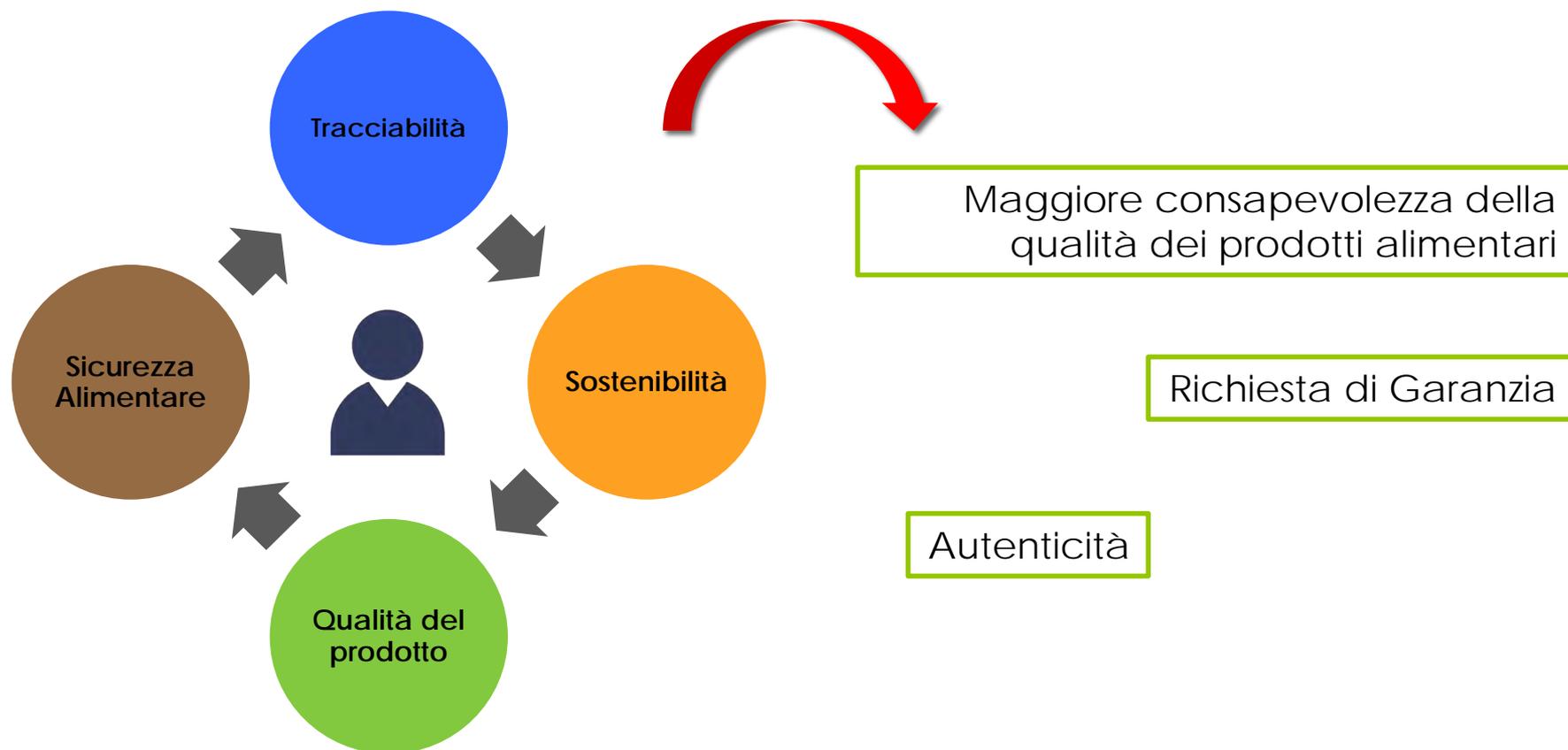


UNIONE EUROPEA



Obiettivi del progetto

Migliorare le prestazioni delle aziende irpine attive nel comparto lattiero-caseario mediante l'introduzione di innovazioni di prodotto e di processo, e **valorizzare** i prodotti lattiero-caseari tipici del territorio.



Valorizzazione (e protezione) dei prodotti di qualità

I prodotti di alta qualità sono spesso soggetti a “frodi”

- Presenza di componenti non dichiarati in etichetta
- omissione di componenti e/o di fasi di lavorazione durante la produzione
- Utilizzo di un genotipo (varietà/razza) diverso da quello dichiarato o la sostituzione di un componente con un altro meno costoso

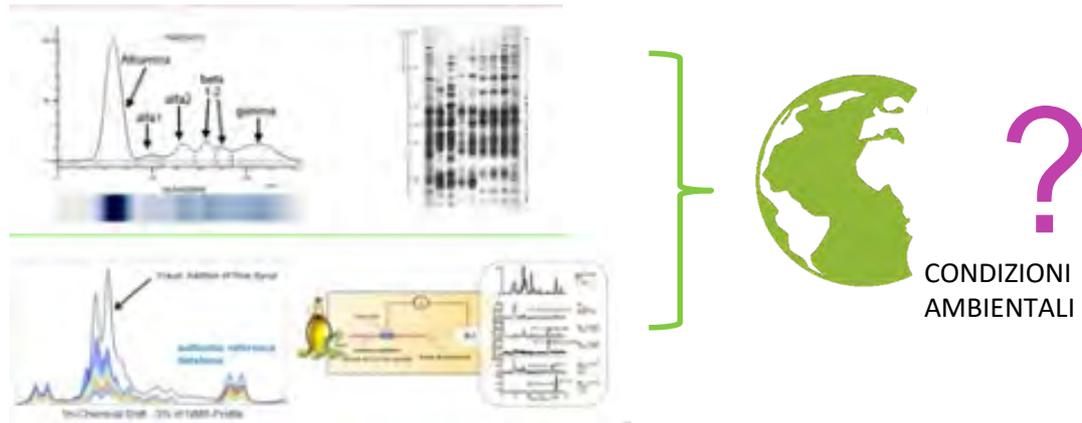


Tracciabilità

“Tracciabilità” significa la capacità di rintracciare e seguire un alimento, un mangime, un animale produttore di alimenti [o una sostanza] attraverso tutti gli stadi della produzione e della distribuzione (Regolamento CE/178/2002).

Al momento di basa su **informazioni documentali**.

Metodi basati su proteine (immunologici, cromatografici, ecc) e metaboliti (HPLC, MS, NMR)

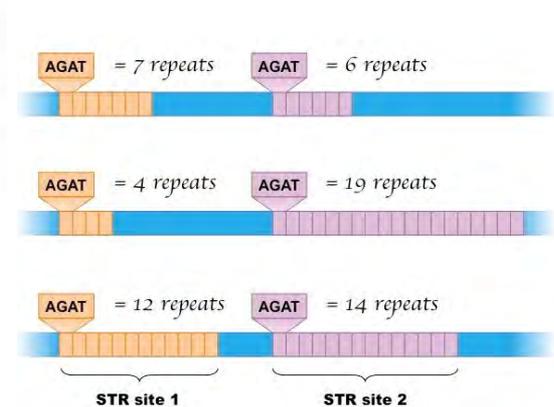
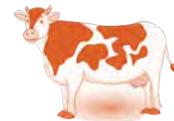
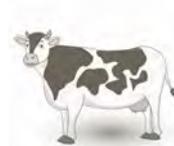


Sono soggetti a variabilità in risposta a fattori ambientali: uno stesso genotipo può produrre metaboliti diversi o diversi genotipi possono produrre gli stessi metaboliti

Tracciabilità genetica

Il DNA è più “resiliente” ai processi di trasformazione alimentare, rispetto ad altri tipi di marcatori.

- Microsatelliti (SSR o STR) sequenze ripetute di DNA non codificante costituiti da unità di 1-5 bp ripetute in tandem.
- Non influenzati dall’ambiente
- Isolabili da regioni codificanti e non codificanti
- Codominanti (marcano entrambe gli alleli)
- Altamente polimorfici
- Altamente riproducibili



Le attività di Biogem nell'ambito del progetto

Fase preliminare:

Set-Up delle metodologie analitiche

1. Ottimizzazione dei procedimenti di estrazione e tipizzazione
2. Sviluppo delle metodologie analitiche (multiplexing di marcatori microsatelliti)
3. Definizione dei criteri di attribuzione e/o di esclusione
4. Identificazione dei marcatori

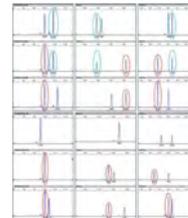
Estrazione del DNA



Amplificazione (PCR)



Acquisizione ed Analisi dei Dati

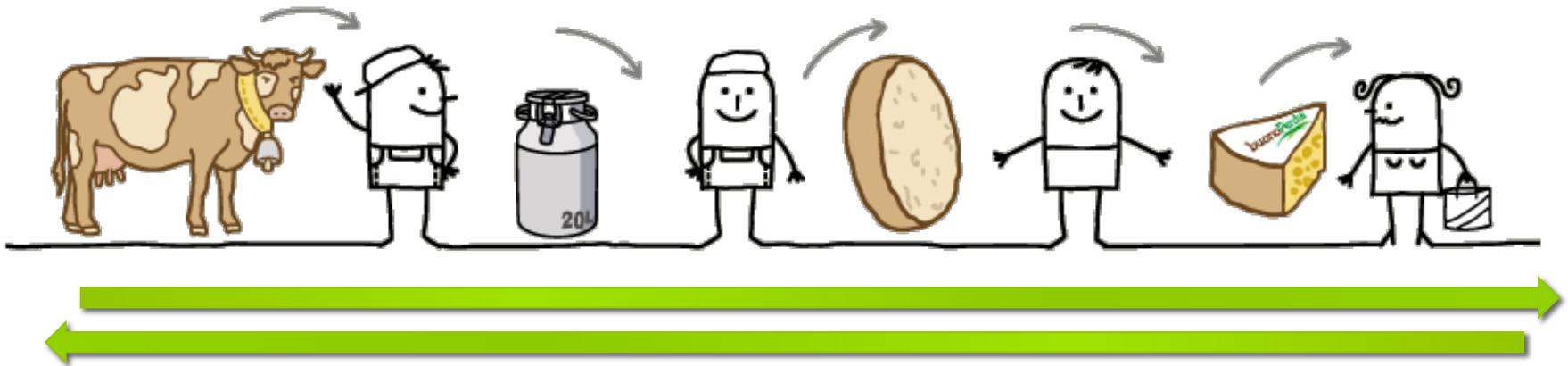


Validazione del metodo



Le attività di Biogem nell'ambito del progetto

Applicazione del metodo sui campioni biologici prelevati nelle diverse fasi di lavorazione e da prodotti finiti



Sviluppo di una tecnologia che consenta di:

- 1) identificare in modo inequivocabile la razza da cui proviene il prodotto
- 2) autenticare univocamente il prodotto finito ottenuto con la materia prima di razze specifiche
- 3) garantire la tracciabilità del prodotto .

I Geni su cui sono state fatte le analisi di RLFP e Sanger Sequencing sono :

K- caseina

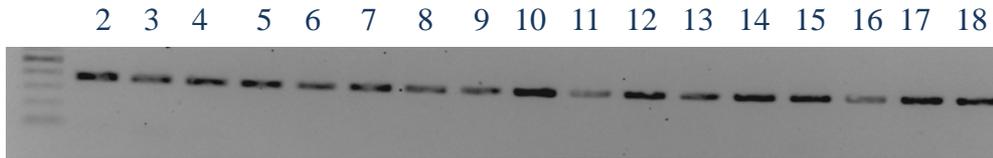
STAT 5

Pit1 Exon 2

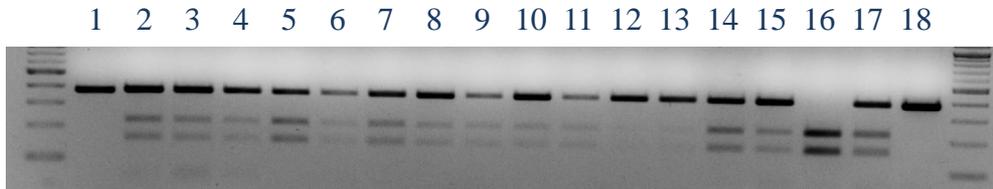
Pit 1 Exon 6

K-CASEIN GENE

1. Controllo negativo
2. Campione 1
3. Campione 2
4. Campione 3
5. D. G.
6. De S.
7. Cors
8. V. G.
9. Campione 21
10. Campione 22
11. Campione 23
12. Campione 24
13. Campione 26
14. Campione 27
15. Formaggio
16. Podolica
17. Bruna alpina
18. Pezzata Rossa



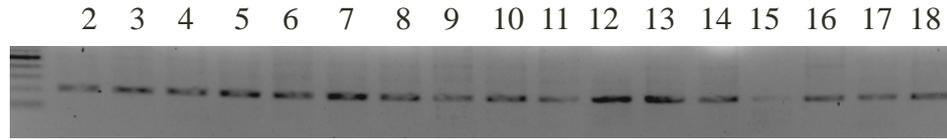
PCR



HindIII - Restriction Enzyme Treatment

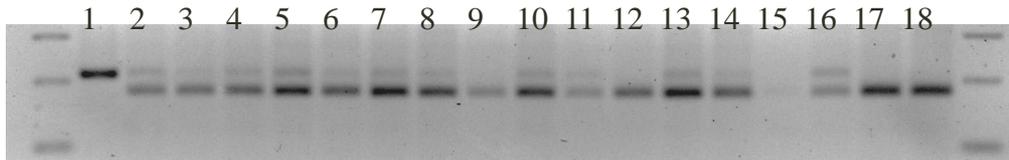
PRODOTTO DI PCR ATTESO 379bp
A/A omozigote 379bp
B/B omozigote 225bp e 154bp
A/B eterozigote 379bp,225bp,154bp

STAT5 GENE



PCR

1. Controllo negativo
2. Campione 1
3. Campione 2
4. Campione 3
5. D. G.
6. De S.
7. Cors.
8. V. G.
9. Campione 21
10. Campione 22
11. Campione 23
12. Campione 24
13. Campione 26
14. Campione 27
15. Formaggio
16. Podolica positive control
17. Bruna alpina
18. Pezzata Rossa

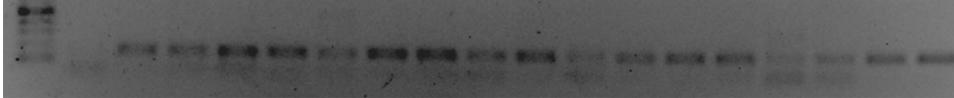


Aval - Restriction Enzyme Treatment

PRODOTTO DI PCR ATTESO 223bp
A/A omozigote 223bp
B/B omozigote 225bp e 154bp
A/B eterozigote 379bp,225bp,154bp

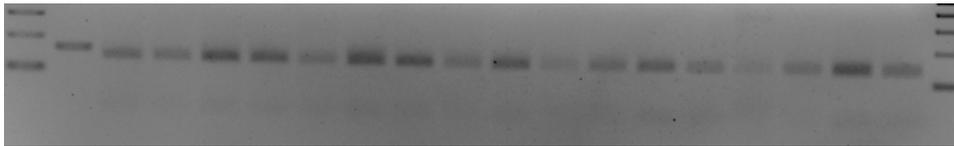
Bovine PIT-1 GENE Exon 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



PCR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



TaqI-v2 60°C Restriction Enzyme Treatment

1. Controllo Negativo
2. Campione 1
3. Campione 2
4. Campione 3
5. Domenico G.
6. De Stasio
7. Corsillo
8. Vincenzo G.
9. Campione 21
10. Campione 22
11. Campione 23
12. Campione 24
13. Campione 26
14. Campione 27
15. Formaggio
16. Podolica
17. Bruna alpina
18. Pezzata Rossa

PRODOTTO DI PCR ATTESO

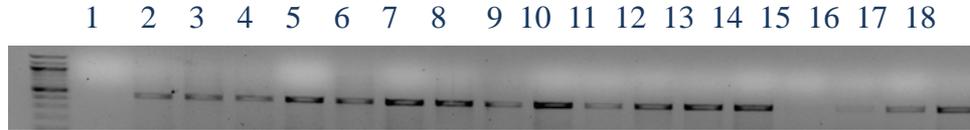
165bp

A/A omozigote 165bp

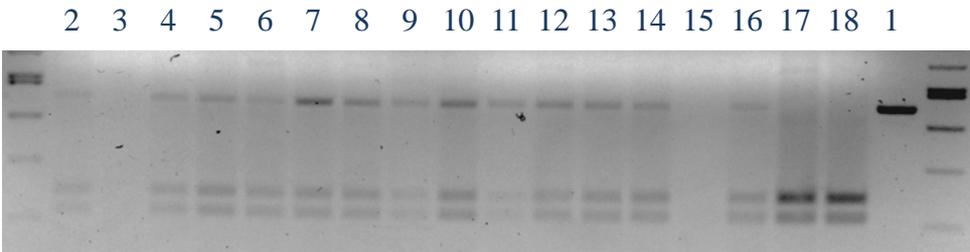
B/B omozigote 138bp e 27bp

A/B eterozigote 165bp 138bp e 27bp

Bovine PIT-1 GENE Exon 6



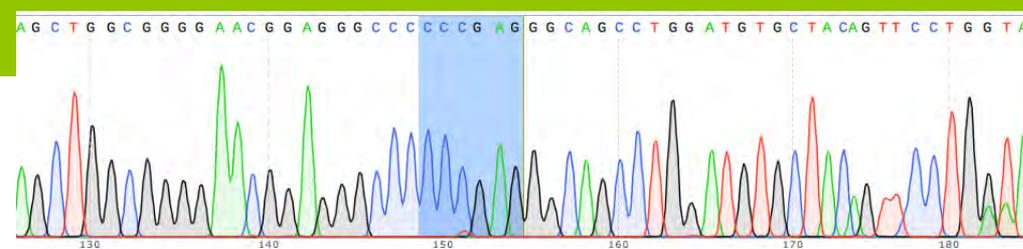
PCR



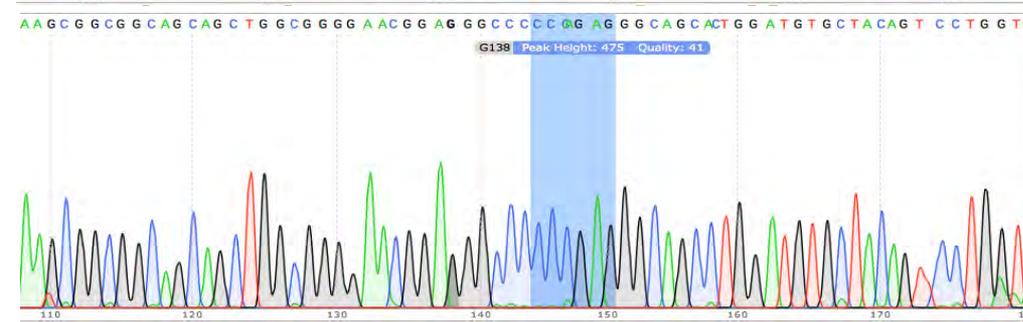
Hinfl - Restriction Enzyme Treatment

1. Controllo Negativo
2. Campione 1
3. Campione 2
4. Campione 3
5. Domenico G.
6. De Stasio
7. Corsillo
8. Vincenzo G.
9. Campione 21
10. Campione 22
11. Campione 23
12. Campione 24
13. Campione 26
14. Campione 27
15. Formaggio
16. Podolica
17. Bruna alpina
18. Pezzata Rossa

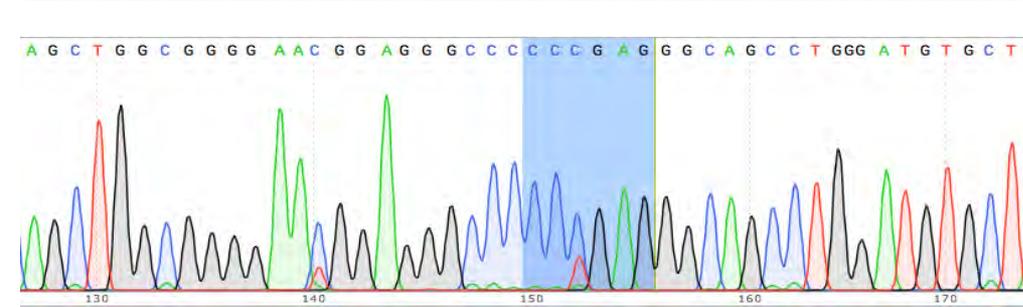
PRODOTTO DI PCR ATTESO 451bp
A/A omozigote 451bp
B/B omozigote 244bp e 207bp
A/B eterozigote 451bp,244bp,207bp



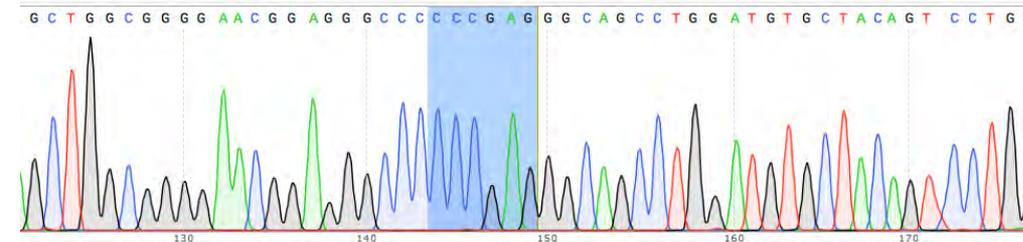
Campione 3 stat 5



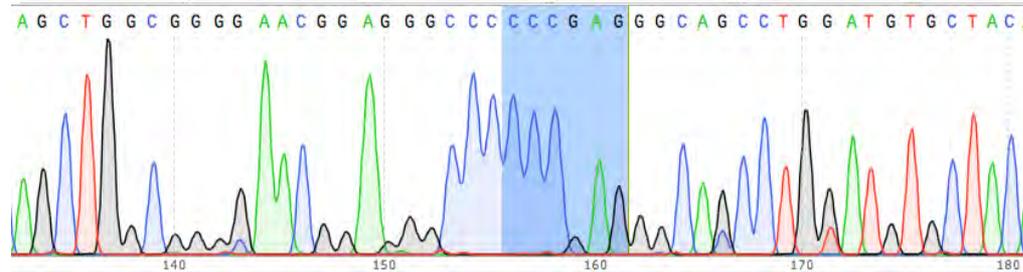
Campione 27



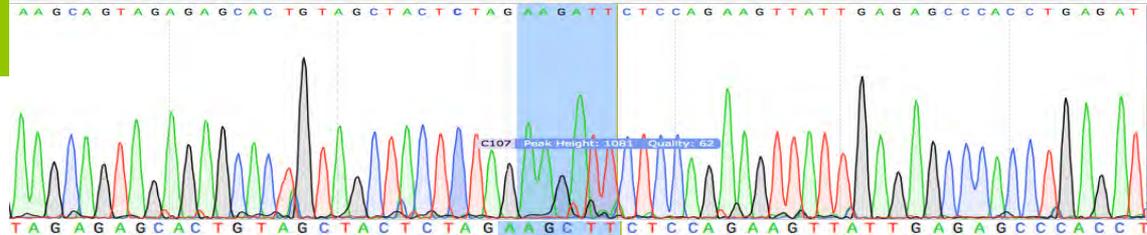
PODOLICA POSITIVE



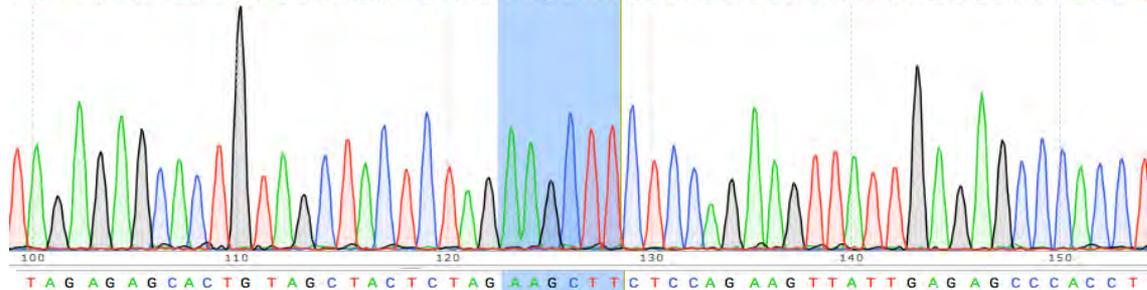
PEZZATA ROSSA NEGATIVE



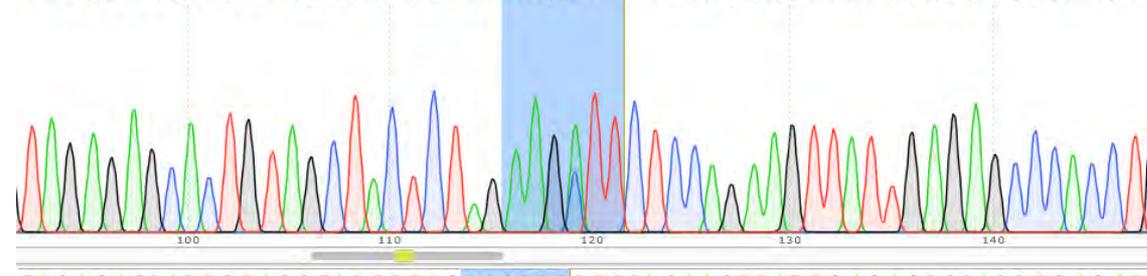
BRUNA ALPINA



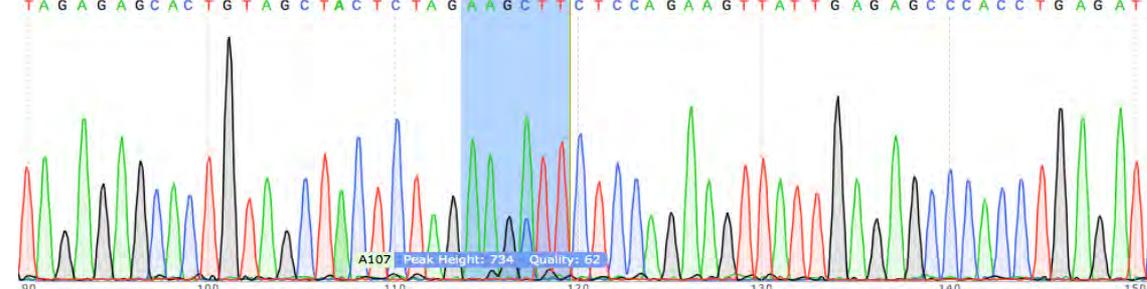
Pezzata rossa k
caseina



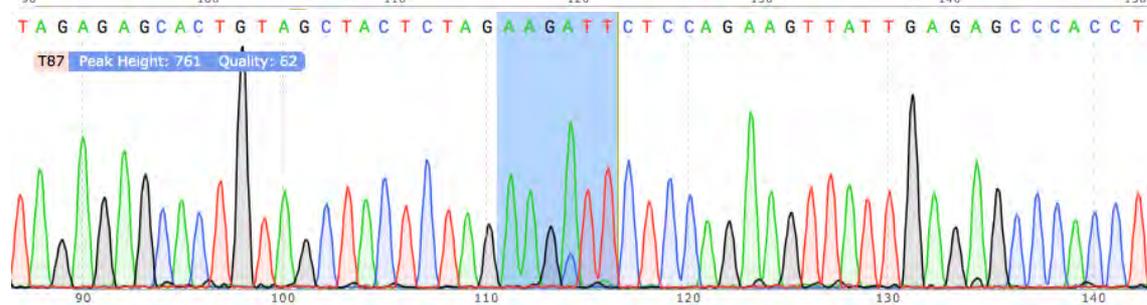
Bruna alpina



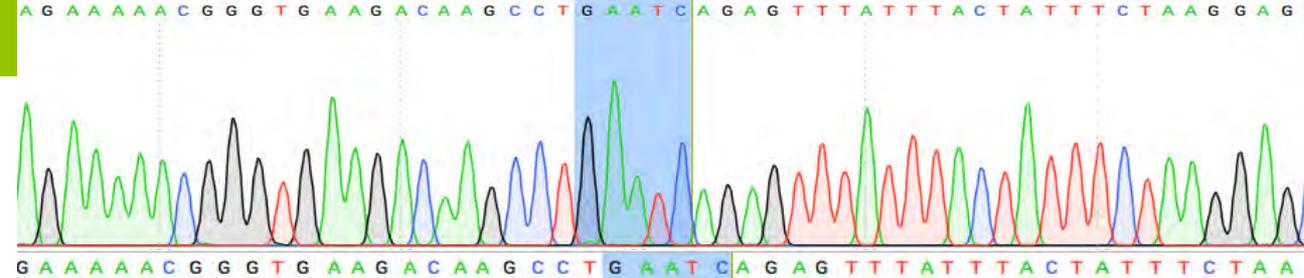
Podolica positive



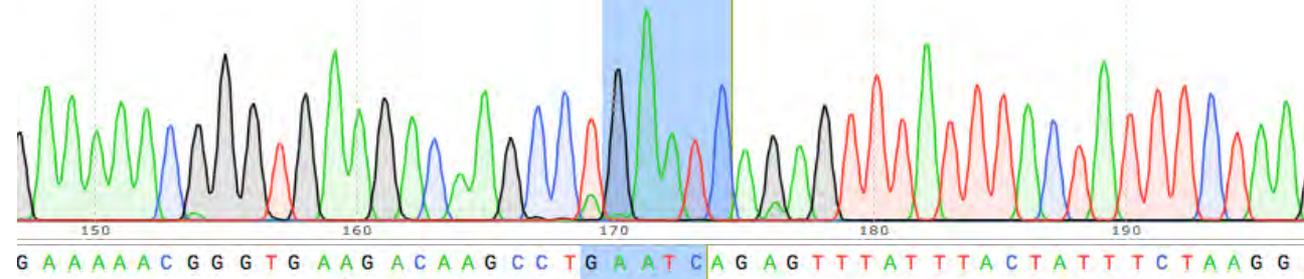
Campione 27



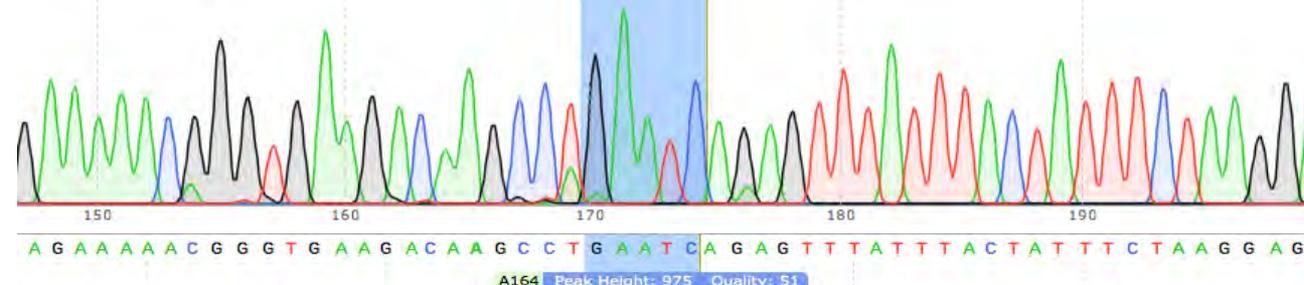
Campione 3



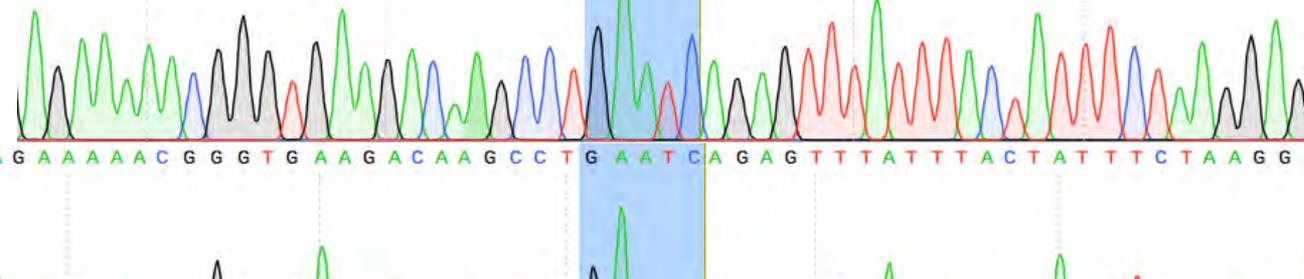
Campione 3 pit
exon 6



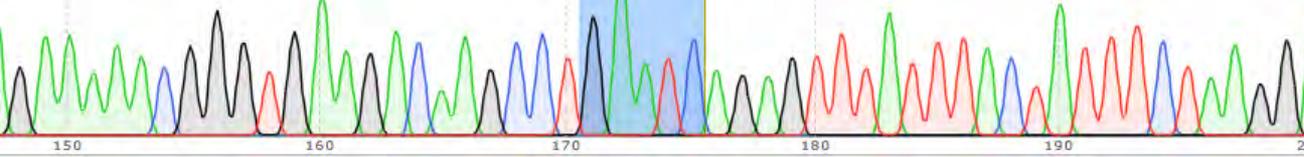
Campione 27



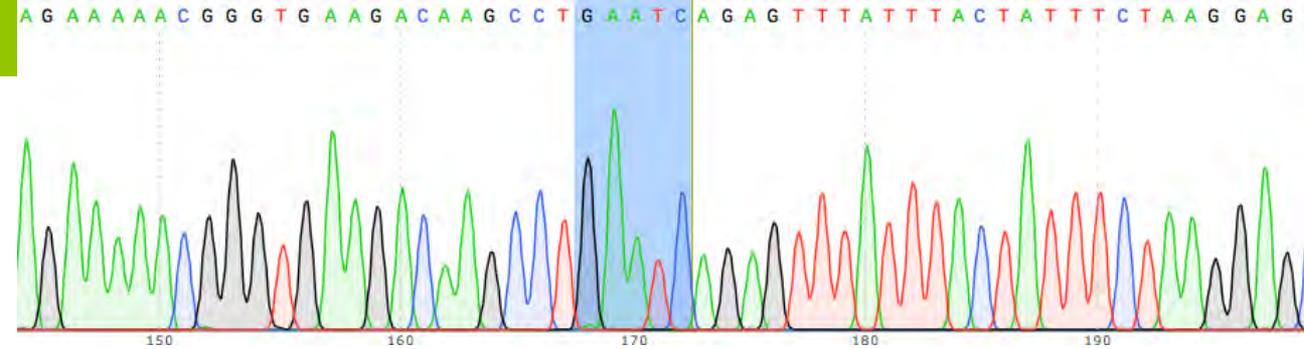
Podolica positive



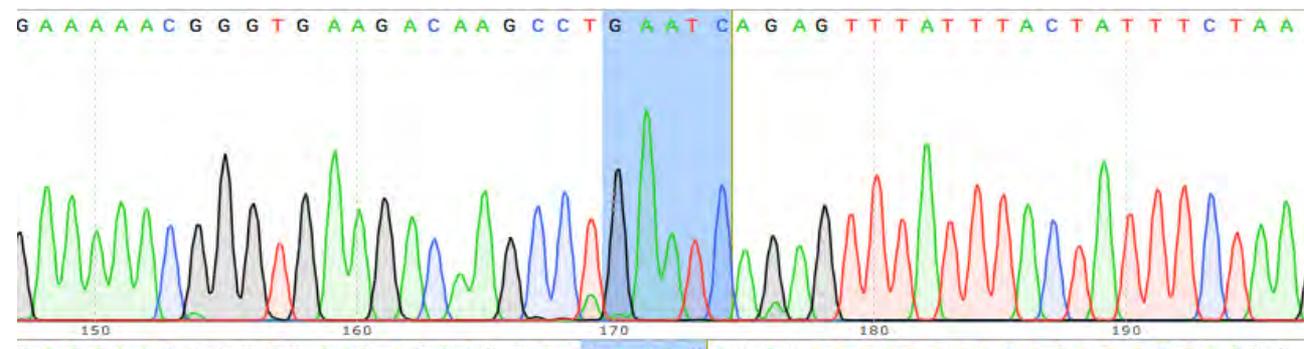
Pezzata rossa



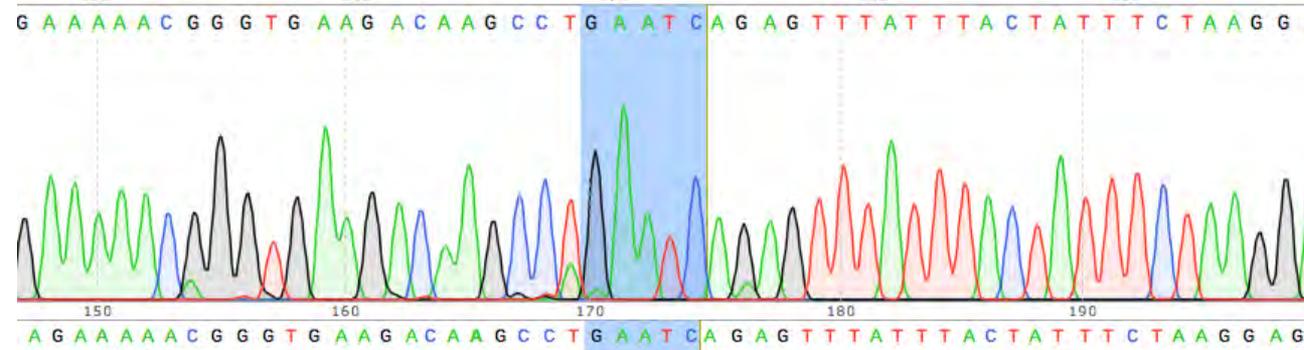
Bruna
alpina



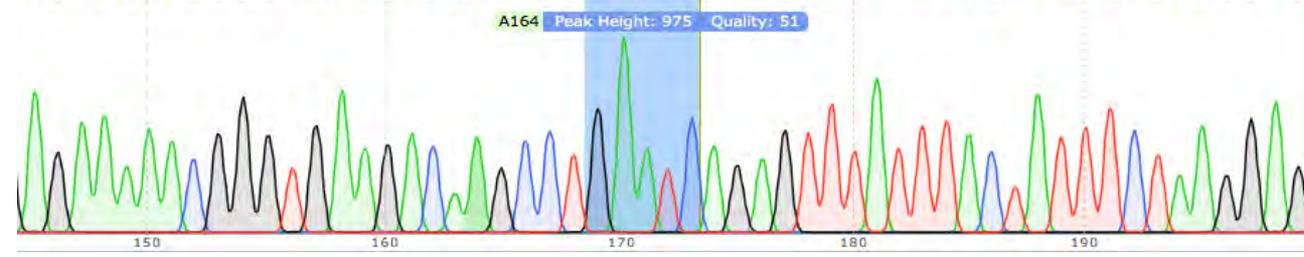
Campione 3 pit
exon 6



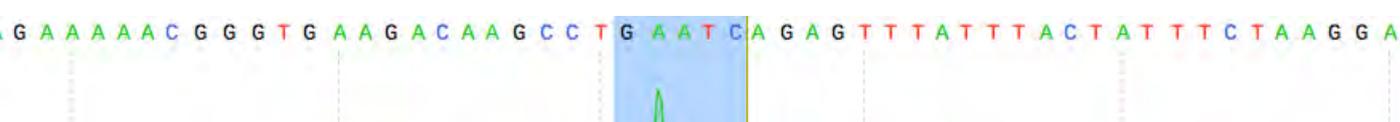
Campione 27



Podolica positive



Pezzata rossa



Bruna
alpina

```

STATA5_gene_sample27          AGGGG---GGACC-----GCCCGAACCCCTCAGAGT---GGCCGAG-AAGC-CCAG-AAGA
STATA5_gene_pezzata_rossa_negati  AGG-----TGACCCG----CCCG--ACCTCAGGAGCT-GGCCGAG-AACCA-CAG-AAGA
STATA5_gene_sample3          GCGGGGC-GGACCCG---GCCCGAACCCCTCAGGAGCT-GGCCGAG-AAGCACCAG-AAGA
STATA5_gene_podolica_wt_positive  AGGGGGCTTAACCCC---CCCCGG-ACCTCAGGAGCTGGGCCGAG-AAGCACCAG-AAGA
STATA5_gene_bruna_alpina_negativ  ACCCGGCTGAACCCCGGTCCCCGGTACCTCAGGAGCTGGGCCGAGAAAGCACCAGAAAGA
                                ***      ****      *****      ***** * * * * *
STATA5_gene_sample27          CCCTGCAGCTGCTGCGGAAGCAGCAGACCATCAATCCTGGAATGACGAGC-TGATCCAGT
STATA5_gene_pezzata_rossa_negati  CCCTGCAGCTGCTGCGGAAGCAGCAGACCATCCATCCCTGGATGACGAGCTTGATCCAGT
STATA5_gene_sample3          CCCTGCAGCTGCTGCGGAAGCAGCAGACCATCA--TCCTGGATGACGAGC-TGATCCAGT
STATA5_gene_podolica_wt_positive  CCCTGCAGCTGCTGCGGAAGCAGCAGACCATCA--TCCTGGATGACGAGC-TGATCCAGT
STATA5_gene_bruna_alpina_negativ  CCCTGCAGCTGCTGCGGAAGCAGCAGACCATCA--TCCTGGATGACGAGC-TGATCCAGT
                                ***** * * ***** *****
STATA5_gene_sample27          GGAAGCGGCGGCAGCAGCTGGCGGGGAACGGAGGGCCCCCAGAGGGCAGCACTGGATGT
STATA5_gene_pezzata_rossa_negati  GGAAGCGGCGGCAGCAGCTGGCGGGGAACGGAGGGCCCCC-GAGGGCAGCCT-GGATGT
STATA5_gene_sample3          GGAAGCGGCGGCAGCAGCTGGCGGGGAACGGAGGGCCCCC-GAGGGCAGCCT-GGATGT
STATA5_gene_podolica_wt_positive  GGAAGCGGCGGCAGCAGCTGGCGGGGAACGGAGGGCCCCC-GAGGGCAGCCTGGGATGT
STATA5_gene_bruna_alpina_negativ  GGAAGCGGCGGCAGCAGCTGGCGGGGAACGGAGGGCCCCC-GAGGGCAGCCT-GGATGT
                                ***** *****
STATA5_gene_sample27          GCTACAGTCCTGG-TACCAAATGCCTTGCAGATGACTACTAATTGC-TGTGTGGGATAAA
STATA5_gene_pezzata_rossa_negati  GCTACAGTCCTGG-TACCAAATGCTTGCC-----A
STATA5_gene_sample3          GCTACAGTTCCTGGTACCAAG-----ATTGTTTATAACAC
STATA5_gene_podolica_wt_positive  GCTACAGTCCTGG-TACCAAATGCTTTTCCACTAAATACTAATTGCTTGTTCATCAAAA
STATA5_gene_bruna_alpina_negativ  GCTACAGTCCTGGATAACCAA-----
                                ***** * * *****

```

```

PITE6_gene_sample      -----AAATGGCTGGCTTAAAGACGCCCTGGG-AGAGACACTTTGGGAGAACAGAATAAG
PITE6_pezzata_rossa_negative  -CCAGTATTGGCTG--CTAAAGACGCCCTGGG-AGAGAACTTT-GGAGAACAGAATAAG
PITE6_bruna_alpina_negative  TCCAGTATTGGCTG--CTAAAGACGCCCTGGG-AGAGACACTTTGGGAGAACAGAATAAG
PITE6_gene_podolica_wt_positive  -----AAGTGGCTGGCCTAAAGACGCCCTGCGCAGAGACACTTTGGGAGAACAGAATAAG
PITE6_gene_sample      -CCGGTAGTGGCTG--CTAAAGACGCCCTGCG-AGAGACACTTTGGGAGAACAGAATAAG
                        * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      CCTTCCTCTCAG-GAGATCCTGCGGATGGCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAAGAAGTGGT
PITE6_pezzata_rossa_negative  CCTTCCTCTCAG-GAGATCCTGCGGATGGCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAAGAAGTGGT
PITE6_bruna_alpina_negative  CCTTCCTCTCAG-GAGATCCTGCGGATGGCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAAGAAGTGGT
PITE6_gene_podolica_wt_positive  CCTTCCTCTCAGTGAATCCTGCGGATGGCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAAGAAGTGGT
PITE6_gene_sample      CCTTCCTCTCAG-GAGATCCTGCGGATGGCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAAGAAGTGGT
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      GAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGGCAGAGAGAAAAACGGGTGAAGACAAGCCTGAATCA
PITE6_pezzata_rossa_negative  GAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGGCAGAGAGAAAAACGGGTGAAGACAAGCCTGAATCA
PITE6_bruna_alpina_negative  GAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGGCAGAGAGAAAAACGGGTGAAGACAAGCCTGAATCA
PITE6_gene_podolica_wt_positive  GAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGGCAGAGAGAAAAACGGGTGAAGACAAGCCTGAATCA
PITE6_gene_sample      GAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGGCAGAGAGAAAAACGGGTGAAGACAAGCCTGAATCA
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      GAGTTTATTTACTATTTCTAAGGAGCATCTCGAATGCAGATAGGCTCTCCTATTGTGTAA
PITE6_pezzata_rossa_negative  GAGTTTATTTACTATTTCTAAGGAGCATCTCGAATGCAGATAGGCTCTCCTATTGTGTAA
PITE6_bruna_alpina_negative  GAGTTTATTTACTATTTCTAAGGAGCATCTCGAATGCAGATAGGCTCTCCTATTGTGTAA
PITE6_gene_podolica_wt_positive  GAGTTTATTTACTATTTCTAAGGAGCATCTCGAATGCAGATAGGCTCTCCTATTGTGTAA
PITE6_gene_sample      GAGTTTATTTACTATTTCTAAGGAGCATCTCGAATGCAGATAGGCTCTCCTATTGTGTAA
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      TAGCGAGTGTTCCTACTTTTCATTCCTTTCTCTTCTCCAGCCAAAATAGAAATAGTTAT
PITE6_pezzata_rossa_negative  TAGCGAGTGTTCCTACTTTTCATTCCTTTCTCTTCTCCAGCCAAAATAGAAATAGTTAT
PITE6_bruna_alpina_negative  TAGCGAGTGTTCCTACTTTTCATTCCTTTCTCTTCTCCAGCCAAAATAGAAATAGTTAT
PITE6_gene_podolica_wt_positive  TAGCGAGTGTTCCTACTTTTCATTCCTTTCTCTTCTCCAGCCAAAATAGAAATAGTTAT
PITE6_gene_sample      TAGCGAGTGTTCCTACTTTTCATTCCTTTCTCTTCTCCAGCCAAAATAGAAATAGTTAT
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      TTGGTTAGCTTCAAAAAATCACATCAGTAATTTTTGCAGAAGTGTTCCTTTTCTACTTTA
PITE6_pezzata_rossa_negative  TTGGTTAGCTTCAAAAAATCACATCAGTAATTTTTGCAGAAGTGTTCCTTTTCTACTTTA
PITE6_bruna_alpina_negative  TTGGTTAGCTTCAAAAAATCACATCAGTAATTTTTGCAGAAGTGTTCCTTTTCTACTTTA
PITE6_gene_podolica_wt_positive  TTGGTTAGCTTCAAAAAATCACATCAGTAATTTTTGCAGAAGTGTTCCTTTTCTACTTTA
PITE6_gene_sample      TTGGTTAGCTTCAAAAAATCACATCAGTAATTTTTGCAGAAGTGTTCCTTTTCTACTTTA
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****
PITE6_gene_sample      AAAATAAATACAATTTAAATTATGTTGATGAATTATTCTCAGAAGGCACATT--GATACA
PITE6_pezzata_rossa_negative  AAAATAAATACAATTTAAATTATGTTGATGAATTATTCTCAGAAGGAA--TTT-GGAACA
PITE6_bruna_alpina_negative  AAAATAAATACAATTTAAATTATGTTGATGAATTATTCTCAGAAGGCACATTTGGGAACA
PITE6_gene_podolica_wt_positive  AAAATAAATACAATTTAAATTATGTTGATGAATTATTCTCAGAAGGCAC--TTT-GGAACA
PITE6_gene_sample      AAAATAAATACAATTTAAATTATGTTGATGAATTATTCTCAGAAGGCACATT--GGTACA
                        ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****

```


KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

GCGCGTCCAGAA--TCAGGGA AAAACAGAAA--ACTAACCTCAATAACA-TCGGTAGAGG
TCCGGGGGAAAAATGCAGGATAAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCA-TTGCTAGTGG
--CCCAAGAATA--TCAGGATAAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCA-TTGCTAGTGG
--TGGTGAGATA--TCAGGA-AAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCA-TTGCTAGTGG
-TCGCTAGAAA--TCAGGATAAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGG
* **** ***** ** * ** * * * * * *

KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

TGAGCCTACAAGTACA-CTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGA
TGAGCCTACAAGTACACCTACCATCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGC
TGAGCCTACAAGTACACCTACCATCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGC
TGAGCCTACAAGTACACCTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGA
TGAGCCTACAAGTACACCTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGC

KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

TTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGC
TTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGC
TTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGC
TTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGC
TTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGC

KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

AGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAAT
GGTCTAAATACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAAT
GGTCTAAATACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAAT
AGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAAT
GGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAATAAGCAAAATGAAT

KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

AACAGCCAAGATTTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGGA
AACAGCCAAGATTTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGGA
AACAGCCAAGATTTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGGA
AACAGCCAAGATTTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGGA
AACAGCCAAGATTTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAACTAGCGTAGATGGA

KCN_gene_pezzata_rossa_negative_
KCN_gene_bruna_alpina_negative_c
KCN_gene_podolica_wt_positive_co
KCN_gene_sample3
KCN_gene_sample27

TAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCGAAAATGGTTTAATTA AAAA-
TAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCGAATGGGGG-CTAATTA AAAA--
TAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCGAATGGGC--CTAATTA AAAA--
TAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCGAATGGGGCCTAATTA A----
TAAATTAATCTGTTACAGAGAAGGCGAATGGGTA-CTAATTA AAGGG

Conclusioni

Le nuove tecnologie stanno cambiando il modo di considerare e applicare la **tracciabilità molecolare** (e l'autenticazione genetica) nella filiera alimentare

L'uso delle tecnologie sviluppate nel progetto contribuiranno alla **valorizzazione** dell'eccellenza dei formaggi irpini **garantendone l'origine e la sicurezza**

La stretta collaborazione tra i ricercatori e i produttori sarà fondamentale per raggiungere buoni risultati a costi sostenibili, che consentano l'applicazione del metodo su larga scala.



formlife

GRAZIE

