

Progetto pilota per la valutazione di parametri di qualità della carne di suini pesanti destinati alla produzione di prosciutti DOP mediante tecnologie innovative genomiche e di processo”



Pork Quality-Innovation (PQ-Inn)

Enti di ricerca (Partner Scientifici)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Agroalimentari, Alma Mater Studiorum -
Università di Bologna (DISTAL-UNIBO)



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Stazione Sperimentale per l'Industria delle
Conserve Alimentari (SSICA) - Fondazione di
Ricerca, PARMA



SSICA

Partenariato

Capofila

F.lli Galloni S.p.A.



Piano di Innovazione



- Operazione 16.2.01: “Supporto per progetti pilota e per lo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie nel settore agricolo e agroindustriale”.
- FOCUS AREA 3A, DGR N. 227 DEL 27 FEBBRAIO 2017.
- Titolo del piano: Progetto pilota per la valutazione di parametri di qualità della carne di suini pesanti destinati alla produzione di prosciutti DOP mediante tecnologie innovative genomiche e di processo” - Pork Quality-Innovation (**PQ-Inn**).
- Durata: 18 mesi, dal 28 agosto 2018 al 27 febbraio 2020 (prorogato fino a luglio 2020 a seguito del DGR 184 del 9 marzo 2020 della RER in seguito all'emergenza COVID-19).



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Obiettivi generali (attività scientifica)



- Sperimentare innovazioni di processo finalizzate a garantire una maggiore qualità intrinseca e salubrità del prosciutto stagionato DOP.
- Introdurre strumentazioni non invasive per valutare e tracciare i prosciutti in produzione.
- Utilizzare tecniche genomiche per individuare le associazioni tra marcatori genetici e indicatori di qualità dei prosciutti freschi e stagionati del circuito DOP.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Azione 3A



Valutazione della Qualità dei prosciutti freschi, dopo salagione e stagionati.

Tracciamento dei prosciutti mediante tecnologie innovative (Induzione Magnetica) con generazione di grandi flussi di dati relativi al peso, alla qualità della coscia fresca (quantità di magro), al sale assorbito durante la salagione, ai cali peso e alla predizione del contenuto di sale del prosciutto stagionato.

I dati ottenuti costituiscono una fonte di informazioni con numerosità idonea per lo studio delle associazioni con pannelli di marcatori genetici selezionati.

Roberta Virgili, Cristina Schivazappa, Nicoletta Simoncini, Angela Faccioli

Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari –
Fondazione di Ricerca



Innovazione di processo. Tecnologia ad induzione magnetica.

Il sistema Ham-Inspector™ scansiona (2/3 sec per prosciutto) i prosciutti freschi e in salagione e predice in modalità non distruttiva la % di magro e la % di sale assorbito

PARAMETRI PREDETTI

Prosciutti freschi

Prosciutti in salagione

	Intervallo	R ²	Errore della stima
Magro, %	54 - 72	0,93	1,15
Sale, % 1°salagione	0,9 - 1,5	0,69	0,12
°	2,0 - 3,5	0,86	0,13

Distribuzione dei prosciutti per allevamento di provenienza

Misure effettuate

Prosciutti freschi

		Allevamento			Totale
		A1	A2	A3	
Replica	1	39	44	38	121
	2	41	39	42	122
Totale		80	83	80	243

Analisi non distruttive su materia prima, prosciutti tracciati e avviati a lavorazione

Prosciutti in salagione

		Allevamento			Totale
		A1	A2	A3	
Replica	1	39	44	38	121
	2	41	39	42	122
Totale		80	83	80	243

Analisi di conferma del sale assorbito predetto da Ham-Inspector™ su \approx 40 prosciutti sezionati a fine salagione

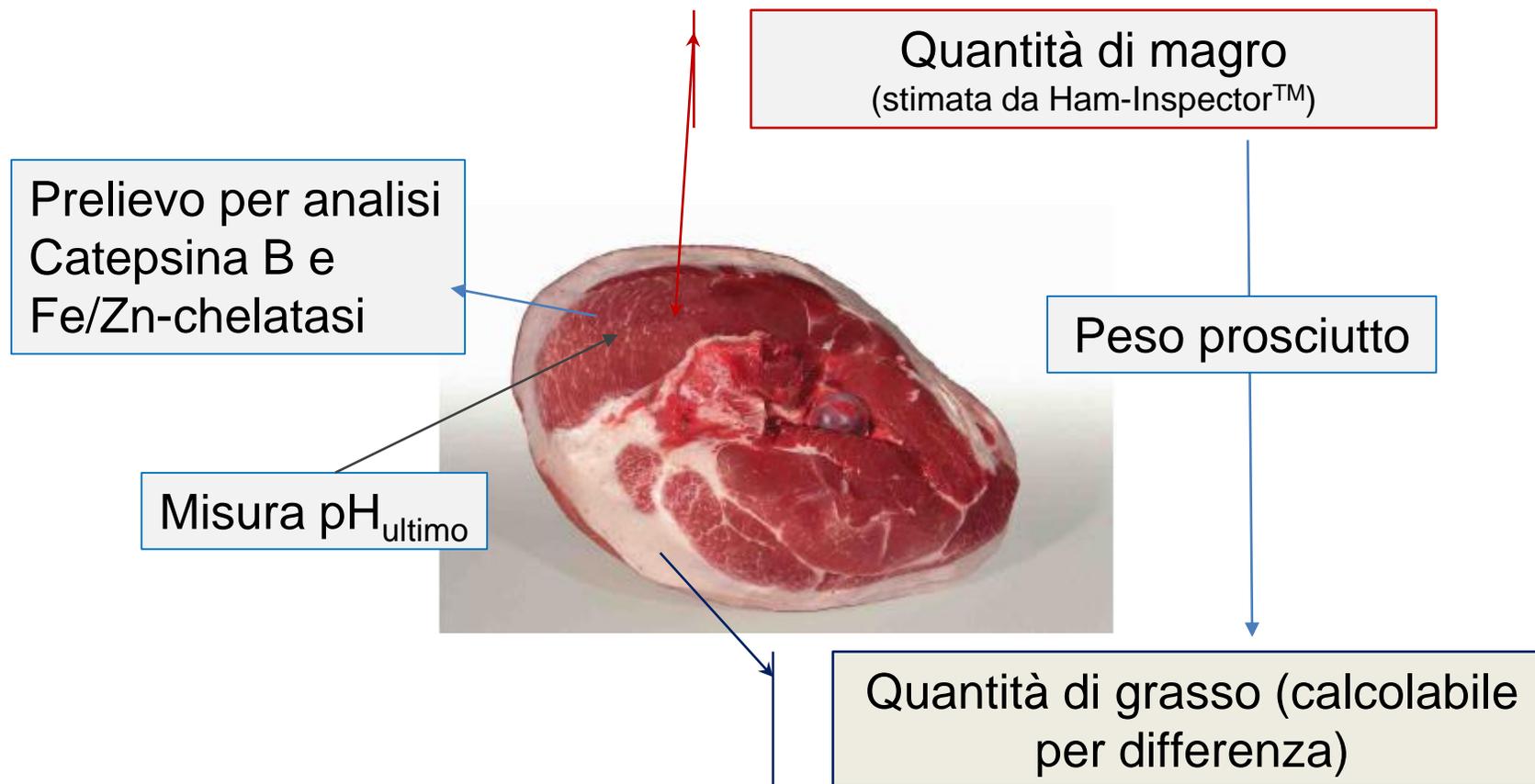
Prosciutti stagionati

		Allevamento			Totale
		A1	A2	A3	
Replica	1	34	34	32	100
	2	34	34	34	102
Totale		68	68	66	202

Misura di parametri tecnologici in produzione, di parametri chimici, fisici e sensoriali nei prosciutti stagionati

Replica 1 = autunno Replica 2 = inverno

Misure effettuate sui prosciutti freschi



pH_{ultimo} : indice di qualità della carne.

Catepsina B: enzima proteolitico, indicatore dell'attitudine del prosciutto alla **proteolisi**.

Fe/Zn chelatasi (Fech): enzima che catalizza l'ingresso di Fe o Zn sulla protoporfirina derivata dalla mioglobina con formazione del **pigmento rosso Zn-protoporfirina** nel prosciutto in stagionatura.

Prosciutti freschi



Sintesi dei risultati

	media	minimo	massimo	ds
Peso	13,90	13,00	14,90	0,46
pH _{ultimo}	5,65	5,48	6,09	0,10
% magro	62,90	57,80	70,60	2,22
Catepsina B	1,47	0,88	2,27	0,30
Fe/Zn chelatasi	33,90	2,20	100,30	23,40

La maggiore variabilità ha riguardato le attività enzimatiche associate con la proteolisi (Catepsina B), e con la formazione del pigmento rosso Zn-protoporfirina (Fe/Zn chelatasi).

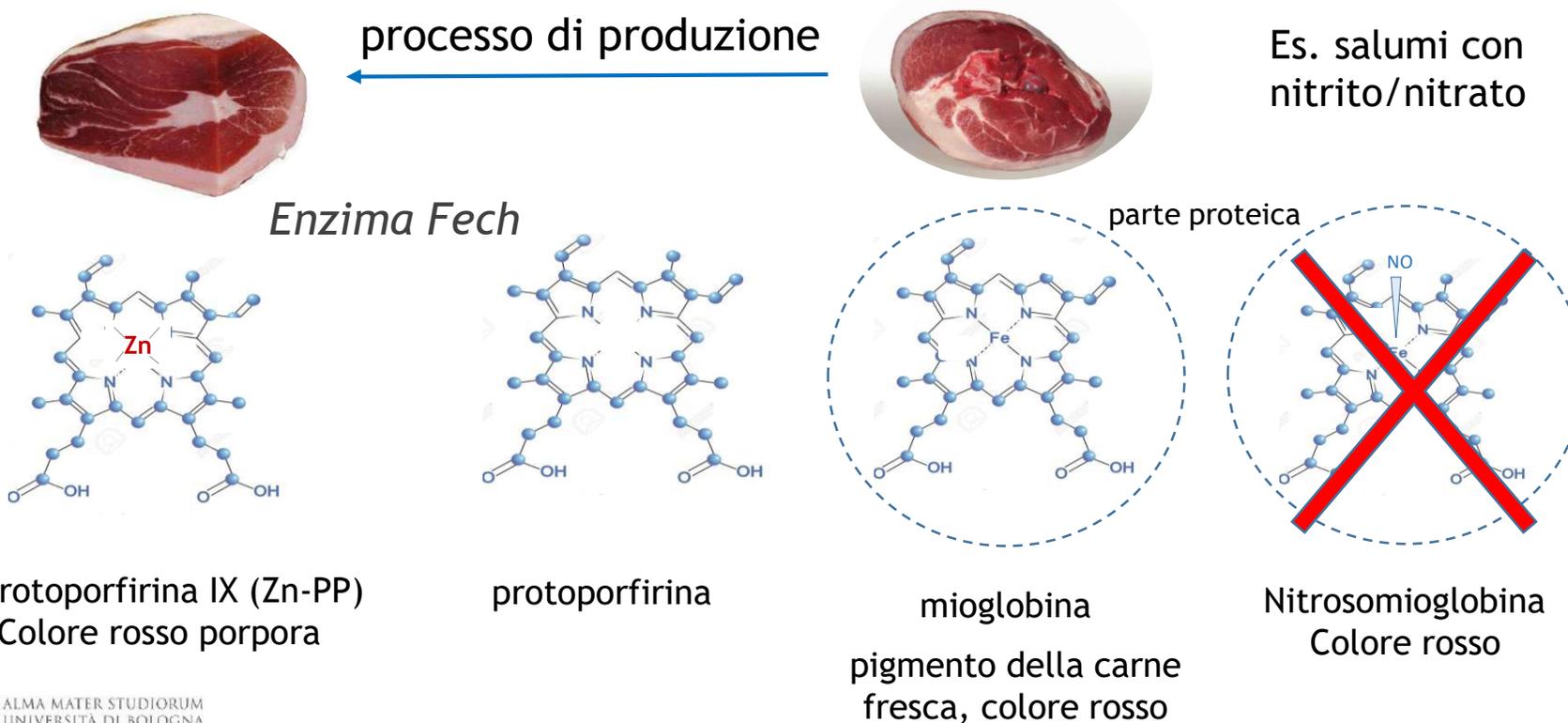
Sintesi delle differenze tra allevamenti

	Allevamento (A)	Replica (R)	A×R
Peso (kg)	SI	NO	SI
Magro, %	SI	NO	SI
CatepsinaB	SI	SI	NO
Fe/Zn chelatasi	SI	SI	NO
pH _{ultimo}	SI	NO	NO

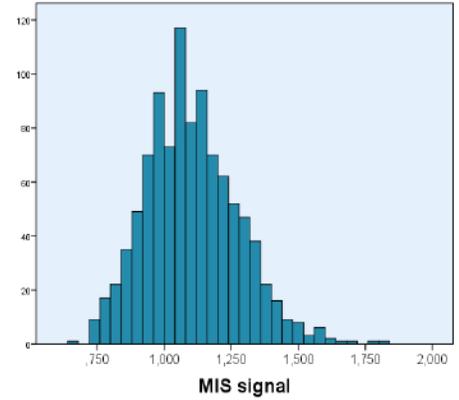
I prosciutti freschi conferiti hanno presentato differenze significative tra allevamenti per i parametri analitici elencati, alimentando la variabilità del prodotto finito.

Sviluppo del colore nel prosciutto DOP italiano

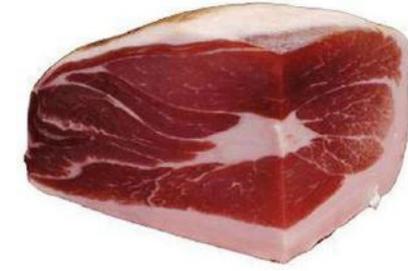
Il prosciutto DOP italiano viene prodotto senza nitrito e nitrato. In assenza di ingredienti che apportano NO (monossido di azoto), non si forma Nitrosomioglobina (rossa) come nei salumi con nitrito, e il colore è dovuto a pigmenti naturali tra cui prevale la Zinco-protoporfirina IX. La formazione di questo pigmento è favorita da [Zn] nel muscolo, proteolisi, riduzione a_w e necessita di lunghi tempi di stagionatura.



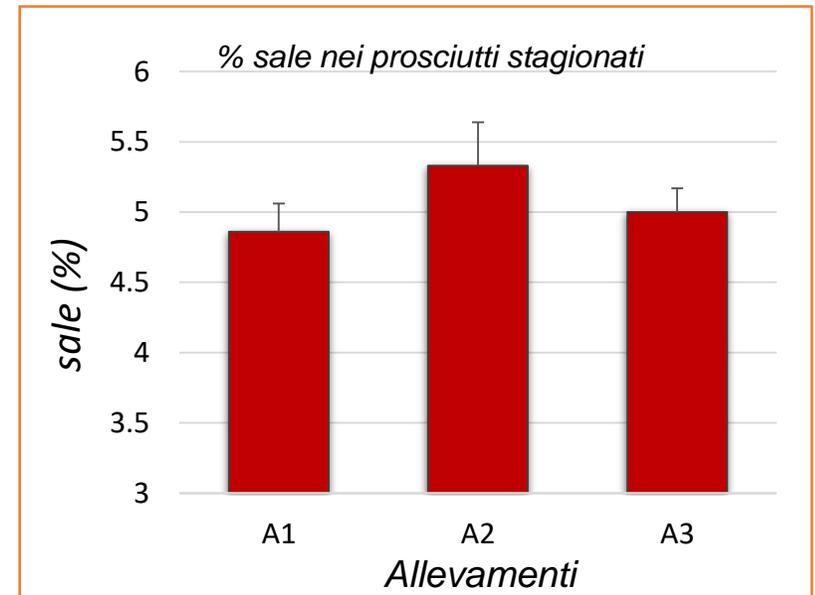
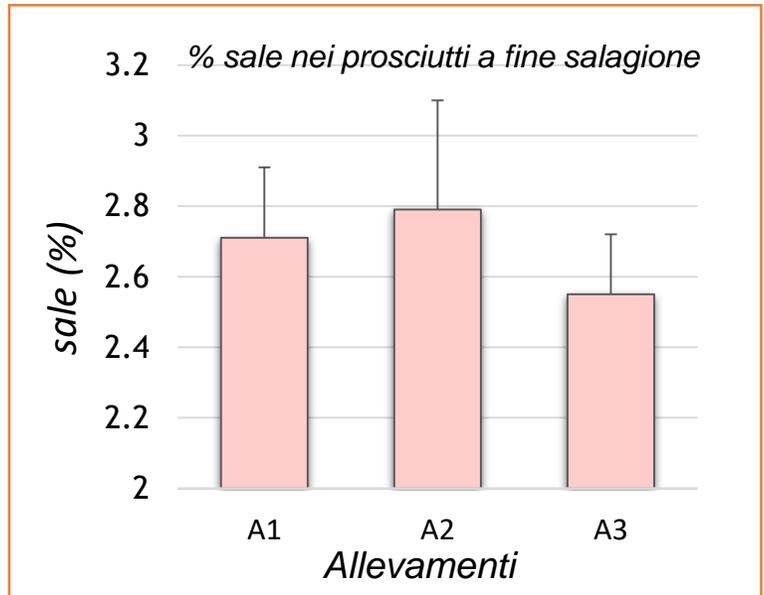
Controllo del sale assorbito dai prosciutti. Scansione in linea con Ham-Inspector™ dei prosciutti in salagione



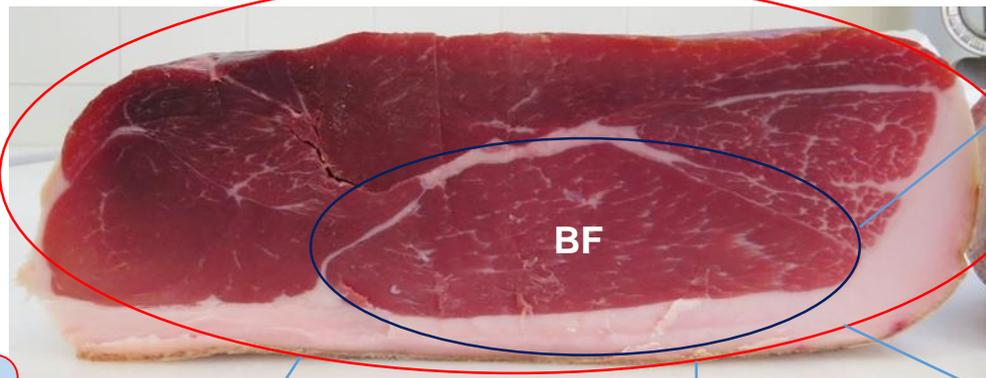
Prosciutti stagionati: previsione e verifica analitica della % sale ($R = 0,83$)



Distribuzione dei segnali di Ham-Inspector™ nei prosciutti in salagione



Prosciutti stagionati (15 mesi)



Analisi di base

- Sale
- Grasso
- Umidità
- Proteine
- Proteolisi

Misura strumentale del colore CIE L*a*b*

Pigmenti:

- Zinco-protoporfirina IX (Zn-PP), ematina, protoporfirina-IX (PPIX), tramite estrazione ed analisi cromatografica

Misure strumentali di consistenza

- durezza, adesività, elasticità, coesività, modulo, deformabilità (Y_t), forza compressione

Analisi sensoriale

Scheda di valutazione (scala 0 – 9)

- Colore muscolo: Intensità colore rosso, rosso-rosato, rosso-porpora, marrone, uniforme
- Colore grasso: rosato, giallo
- Consistenza muscolo e grasso di copertura
- Grasso: grado di marezza, untuosità del grasso
- Sintesi descrittori:

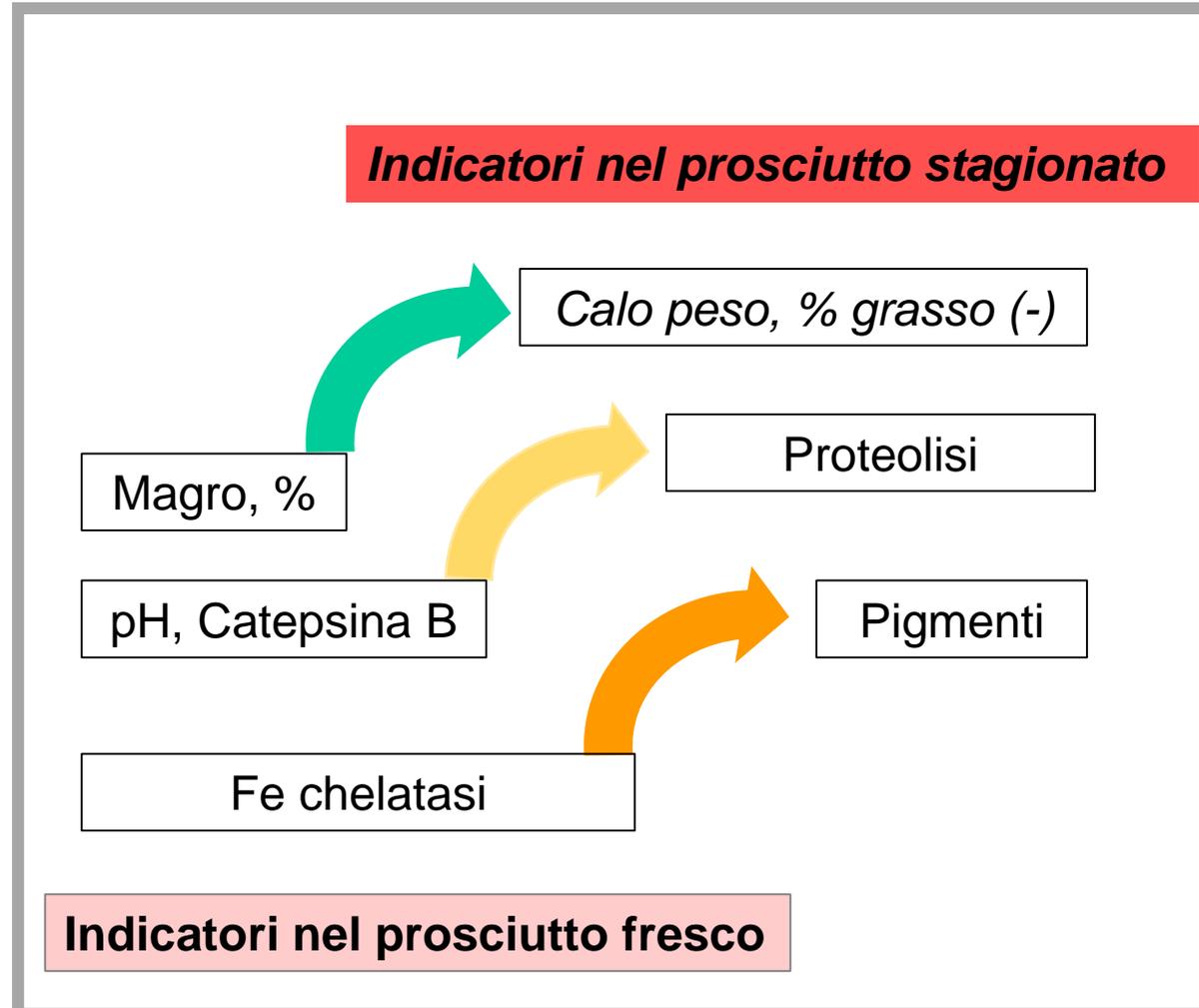
QUALITÀ GENERALE

Panel: 10 assaggiatori esperti

A1, A2 e A3 differiscono ($P < 0,05$) per la maggior parte dei parametri misurati

Correlazioni tra parametri del prosciutto fresco e stagionato

I parametri analitici dei prosciutti stagionati hanno mostrato correlazioni significative con quelli del prosciutto fresco.



La correlazione positiva tra il pigmento Zn-protoporfirina IX del prosciutto stagionato e l'attività dell'enzima Fe/Zn chelatasi nel prosciutto fresco è uno dei risultati più innovativi del progetto. Indica la predisposizione della materia prima allo sviluppo del colore rosso nel prosciutto stagionato.

Indicatori analitici di qualità sensoriale del prosciutto stagionato DOP italiano

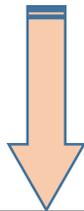
Punteggio «QUALITÀ GENERALE (0-9)» all'analisi sensoriale

Punteggi al 10° percentile di «Qualità Generale»

3,7-4,7

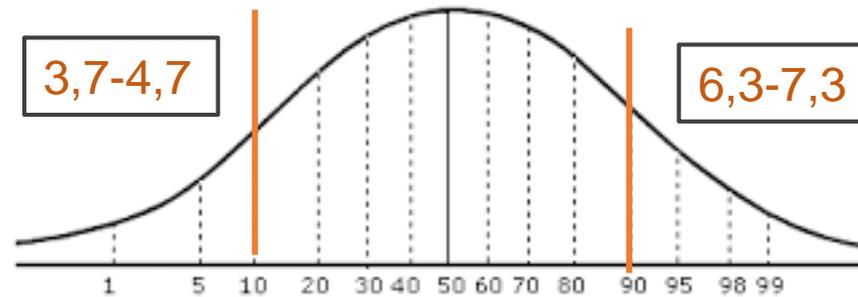
6,3-7,3

Punteggi dal 90° percentile di «Qualità Generale»



Parametri che aumentano ($P < 0,05$) nei prosciutti peggiori per QUALITÀ GENERALE:

Catepsina B, *deformabilità (Y2, Y10)*, *indici colorimetrici b^* e Hue/tinta*, [proteolisi], [%grasso nella fetta], colore marrone, marezzatura, grasso giallo



Punteggi percentili



Parametri che aumentano ($P < 0,05$) nei prosciutti migliori per QUALITÀ GENERALE:

pH_{ultimo} , *Forza di compressione*, [pigmenti], intensità del rosso, colore rosso-rosato, uniformità del colore, consistenza del muscolo, grasso rosato

Analisi delle componenti principali in 200 prosciutti stagionati



Allevamenti

Allevamento 1:

Fornisce i prosciutti con colore più rosso porpora e grasso più rosato

Allevamento 2:

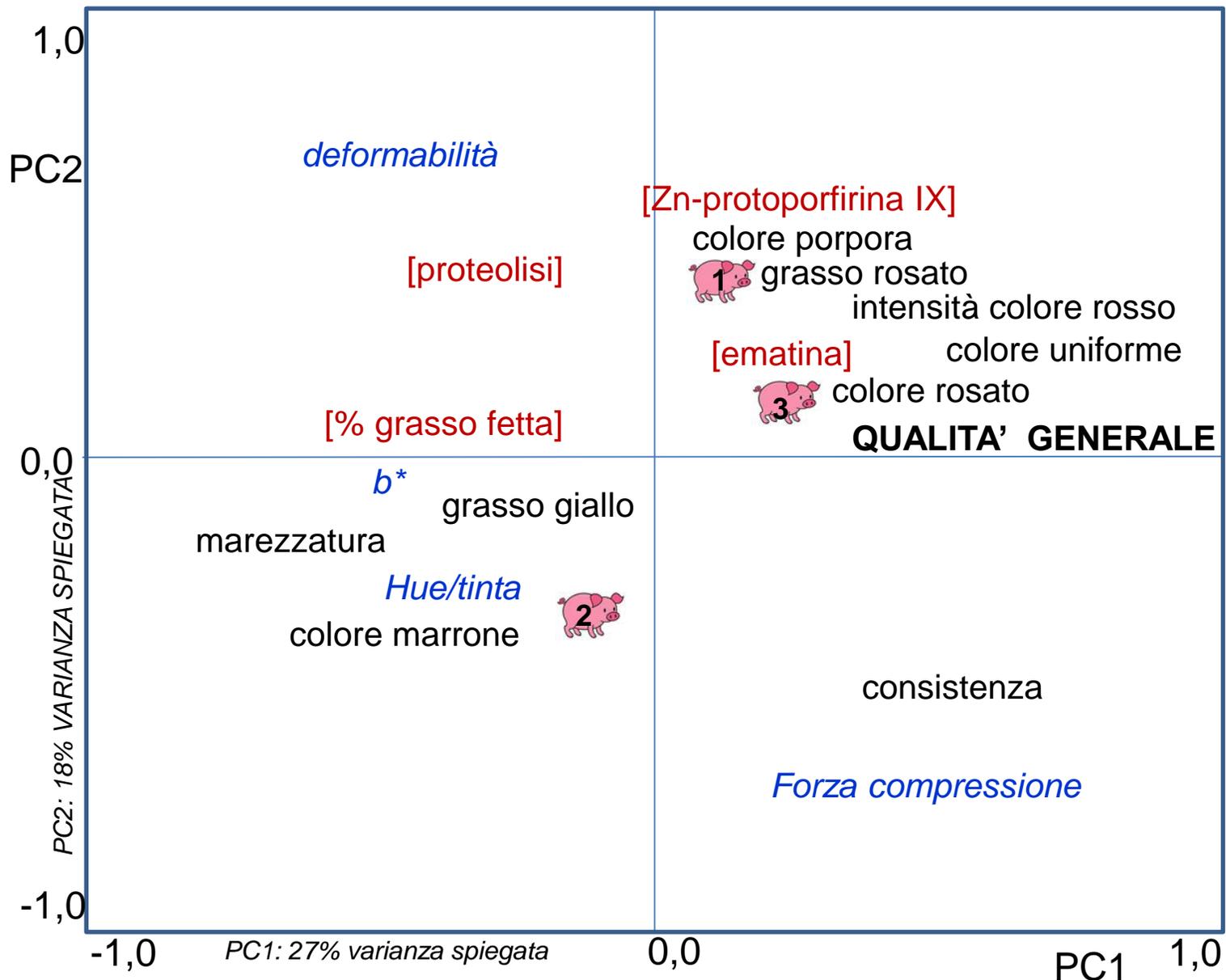
Fornisce i prosciutti di minor qualità a causa del colore marrone, dell'eccesso di grasso e marezzatura

Allevamenti 1 e 2:

Maggiore incidenza di prosciutti molli ed eccessiva proteolisi

Allevamento 3:

Fornisce i prosciutti migliori per tonalità del colore e consistenza



Azione 3B



Definizione e applicazione di un pannello di marcatori del DNA specifico per valutare la possibilità di definire precocemente la qualità per il prosciutto DOP, identificare e tracciare l'origine delle linee genetiche dei suini, impostare un piano di rintracciabilità di filiera.

Paolo Zambonelli, Jacopo Vegni, Martina Zappaterra, Roberta Davoli.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Università degli Studi di Bologna.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



SSICA
SUAZIONE SPERIMENTALE PER L'INDUSTRIA DELLE CONIUGATE ALCOLICHE
FONDAZIONE DI RICERCA

Materiali e metodi: allevamenti e animali campionati

Linee genetiche utilizzate in ciascuno dei tre allevamenti compresi nella prova.

	Genetica utilizzata
Allevamento 1	IDU x ILW
Allevamento 2	(IDU x ILW) x (ILW x ILA)
Allevamento 3	IDU x ILW

Suni campionati per ciascun allevamento e giornata di macellazione.

	Macellazione 1	Macellazione 2	TOTALE
Allevamento 1	36	41	77
Allevamento 2	44	39	83
Allevamento 3	38	42	80
TOTALE	118	122	240

Materiali e metodi: fenotipi



Fenotipi misurati nei campioni utilizzati per la prova.

Sono stati testati **75 fenotipi** misurati al macello, al salumificio Galloni o dalla Stazione sperimentale (SSICA). Nella tabella che segue sono riportati solo gli 8 fenotipi per i quali è stata trovata un'associazione altamente significativa con marcatori del DNA.

Carattere	Prosciutto	Descrizione
fech	fresco	attività dell'enzima Zn-Fe chelatasi
Hue ST	stagionato	Tinta ($\arctan(b^*/a^*)$), determinata nel muscolo <i>Semitendinosus</i>
coesione SM	stagionato	forza dei legami interni di struttura del campione, adimensionale, determinata nel muscolo <i>Semimembranosus</i>
Y2 per ST	stagionato	Test SR: decadimento della forza dopo 2 secondi dalla compressione del 25%, adimensionale, determinata nel muscolo <i>Semitendinosus</i>
Y10 per ST	stagionato	Test SR: decadimento della forza dopo 10 secondi dalla compressione del 25%, adimensionale, determinata nel muscolo <i>Semitendinosus</i>
Y2 per SM	stagionato	Test SR: decadimento della forza dopo 2 secondi dalla compressione del 25%, adimensionale, determinata nel muscolo <i>Semimembranosus</i>
Y10 per SM	stagionato	Test SR: decadimento della forza dopo 10 secondi dalla compressione del 25%, adimensionale, determinata nel muscolo <i>Semimembranosus</i>
Zn-PP	stagionato	μg di ZnPP /g di campione (fetta centrale privata del grasso sottocutaneo e del grasso intermuscolare)

Materiali e metodi: filtraggio del dataset



Genotipizzazione dei **240** campioni con pannello Illumina GeneSeek® Genomic Profiler (GGP) porcine genotyping array 70k, contenente **68516** polimorfismi)

Lo studio all'inizio ha previsto un'operazione di verifica dei dati disponibili, filtraggio, ottenuto con l'uso dei programmi PLINK e GenABEL. I parametri utilizzati per il filtraggio sono stati i seguenti:

- Frequenza dell'allele minore: almeno 5% (per la rappresentazione degli SNP significativi è stato scelto di usare una soglia più permissiva della frequenza dell'allele minore (>15%) in modo da consentire di avere una distribuzione dei genotipi più adeguata per una eventuale selezione da effettuarsi usando questi marcatori);
- SNP con genotipi utilizzabili: almeno il 90% di genotipi utilizzabili;
- Campioni con genotipi utilizzabili: almeno il 90% di genotipi utilizzabili;
- Equilibrio di Hardy-Weinberg: in equilibrio se $P > 0,001$;
- Identity by state: $< 0,9$ (somiglianza genetica tra i campioni).

Al termine dei filtri sono rimasti **51116** SNP e **239** campioni.

Il dataset filtrato è stato utilizzato per lo studio di associazione.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



STAZIONE Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari
FONDAZIONE DI RICERCA

Materiali e metodi: studio di associazione



Per lo studio di associazione è stato usato il programma GenAbel con opzione Grammar-gamma.

Il modello statistico usato per analizzare ciascun fenotipo considerava i seguenti parametri:

- giorno di macellazione;
- allevamento (che include la genetica utilizzata in ogni allevamento);
- sesso degli animali;
- matrice di parentela genomica.

L'elaborazione è avvenuta in due fasi. I residui del primo modello sono stati usati per il calcolo dell'effetto genico di ogni SNP su ciascun carattere.

Per le analisi è stata usata la mappa dei polimorfismi aggiornata alla più recente versione del genoma suino (11.1) consentendo di identificare con migliore accuratezza la posizione dei singoli marcatori e permettendo un allineamento diretto con la mappa genomica in formato grafico disponibile su siti dedicati (es. ENSEMBL).



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Marcatori più significativi individuati con l'analisi di associazione.

Carattere	SNP	SSC	Posizione	N	Effetto allele 2	Pc1df
fech	ASGA0004152	1	106877209	234	-4,7357	2,53E-15
	DIAS0002366		106917692	234	-4,7357	2,53E-15
	ALGA0005395		106,952113	234	-4,6534	2,65E-15
	H3GA0002488		107100243	234	-4,3303	1,02E-12
	ASGA0095614		106683184	234	-4,4245	4,87E-12
	ASGA0004144		106697548	234	-4,4245	4,87E-12
	ASGA0004161		106823633	234	-4,7629	1,53E-10
	ALGA0005414		107261641	234	-4,0365	3,42E-10
	ALGA0005524		110947652	234	4,1262	1,63E-08
	INRA0003923		116359904	234	-3,2867	1,90E-07
	H3GA0002483		106679629	234	2,8654	1,10E-06
Hue ST	WU_10.2_11_57302473	11	52539469	197	-1,4056	7,77E-07
Coesione SM	H3GA0000401	1	4654738	193	-0,0077	4,48E-07
Y2 per ST	ASGA0099602	8	18680120	197	-0,0103	4,24E-08
Y10 per ST	ASGA0099602	8	18680120	197	-0,0093	1,20E-07
Y2 per SM	ALGA0039432	7	21629569	197	0,0181	1,35E-06
Y10 per SM	ALGA0039432	7	21629569	197	0,0173	1,37E-07
ZnPP	WU_10.2_14_5067103	14	4699029	199	3,5822	2,89E-07
	ASGA0060611		4717938	199	3,5822	2,89E-07
	ASGA0060615		4747985	199	3,5002	4,63E-07

Significatività a livello genomico all'1%
 Significatività a livello genomico al 5%
 Significatività a livello di cromosoma all'1%

Risultati: frequenze alleliche e conta dei genotipi

Frequenze alleliche e conta dei genotipi ottenuti per i marcatori significativi.

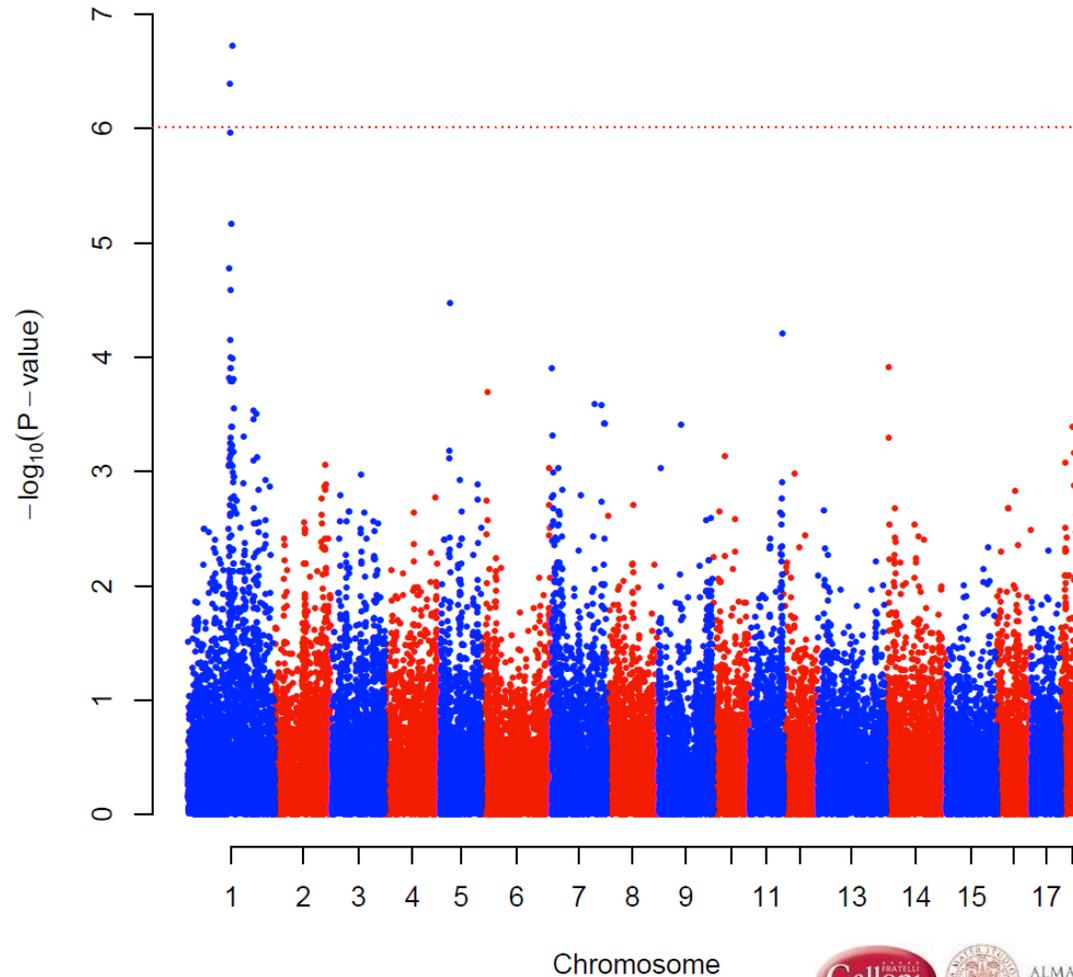
Carattere	SNP	Allele 1	Allele 2	Genotipo 11	Genotipo 12	Genotipo 22
fech	ASGA0004152	0,55	0,45	77	106	52
	DIAS0002366	0,59	0,41	90	97	48
	ALGA0005395	0,51	0,49	65	112	58
	H3GA0002488	0,52	0,48	59	125	51
	ASGA0095614	0,66	0,34	106	99	29
	ASGA0004144	0,69	0,31	112	99	24
	ASGA0004161	0,76	0,24	134	87	13
	ALGA0005414	0,59	0,41	70	136	29
	ALGA0005524	0,71	0,29	113	107	15
	INRA0003923	0,70	0,30	120	91	24
	H3GA0002483	0,67	0,33	107	99	29
Hue ST	WU_10.2_11_57302473	0,55	0,45	51	116	30
coesione SM	H3GA0000401	0,63	0,37	69	105	19
Y2 per ST	ASGA0099602	0,61	0,39	66	109	22
Y10 per ST	ASGA0099602	0,61	0,39	66	109	22
Y2 per SM	ALGA0039432	0,66	0,34	93	75	29
Y10 per SM	ALGA0039432	0,66	0,34	93	75	29
Zn-PP	WU_10.2_14_5067103	0,83	0,17	138	55	6
	ASGA0060611	0,57	0,43	61	106	32
	ASGA0060615	0,64	0,36	80	95	24



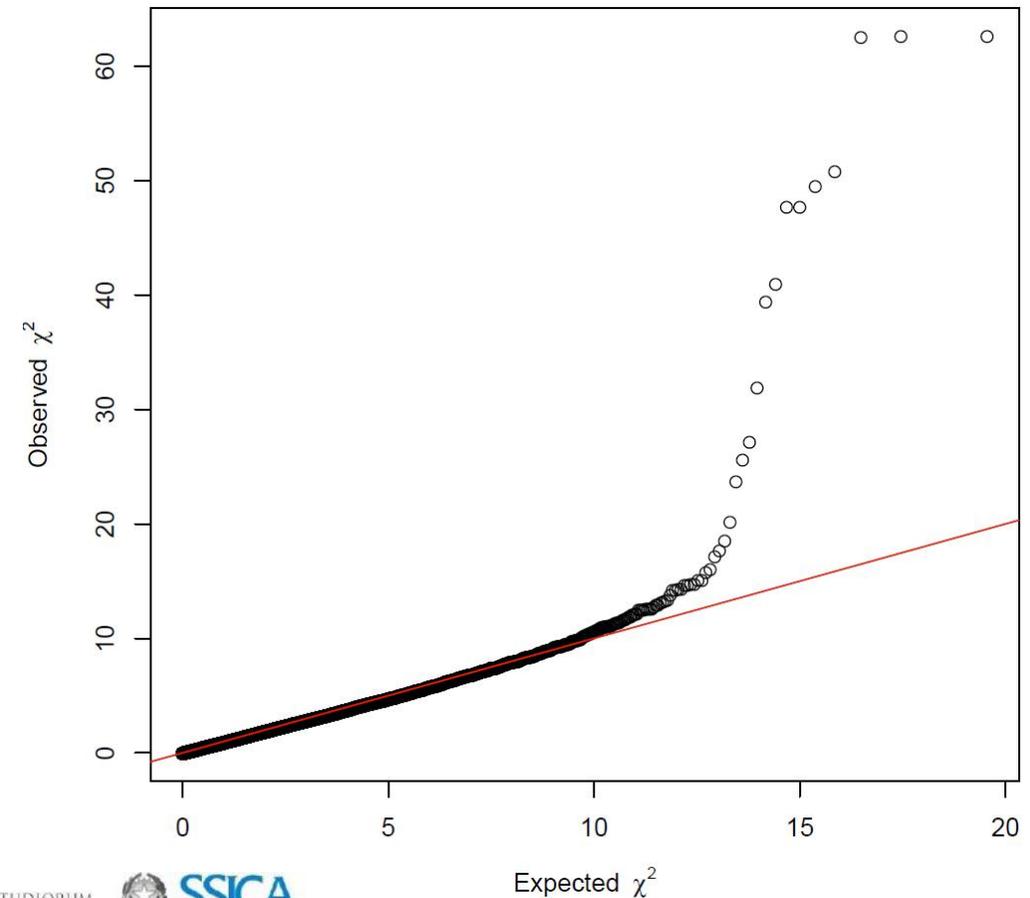
Risultati: rappresentazione grafica dei risultati ottenuti per il carattere fenotipico fech



Manhattan plot

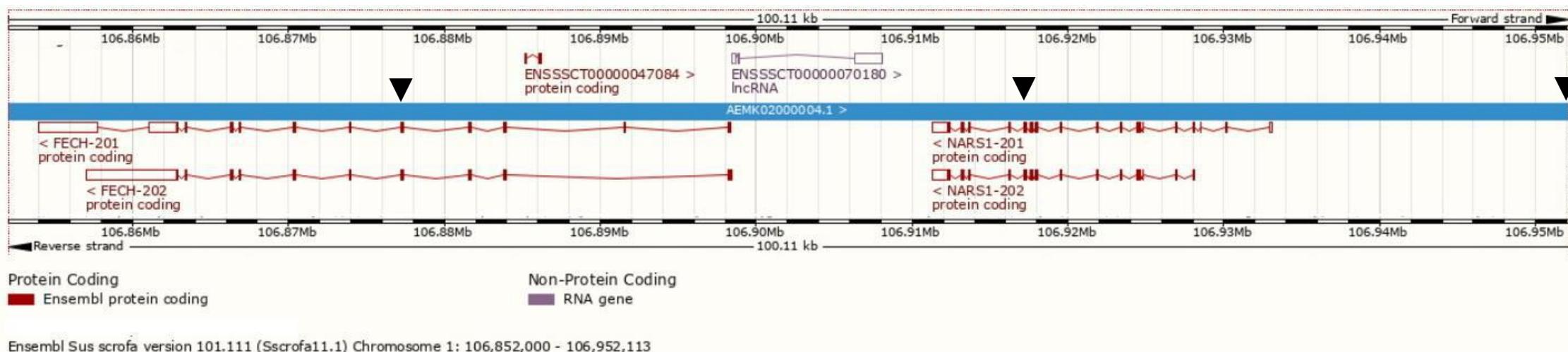


Q-Q plot



Risultati: mappa genomica della regione più significativa per il carattere fenotipico fech

Regione del **cromosoma di suino 1** dove è localizzato il gene *FECH* e altri geni (*NARS1*, ENSSSCG00000047084, ENSSSCG00000070180) che mappano vicino a questo gene.



Le posizioni dei 3 SNP più significativi sono indicati da frecce nere. L'SNP indicato dalla freccia più a sinistra è localizzato in un esone del gene *FECH* e provoca un cambiamento di aminoacido nella proteina.

Nelle altre regioni genomiche in cui mappano i polimorfismi significativi non sono presenti geni.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



SSICA
ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'INDUSTRIA DELLE CARNEE AL MEZZO
FONDAZIONE DI RICERCA



UNIONE EUROPEA
Fondo Europeo Agricolo
per lo Sviluppo Rurale



Regione Emilia-Romagna

L'Europa investe nelle zone rurali

Conclusioni complessive azioni 3A e 3B



Applicazione in prosciuttificio di un metodo on-line non invasivo per la stima di:

- contenuto di carne magra nei prosciutti freschi;
- sale assorbito dai prosciutti in salagione;
- contenuto di sale del prosciutto stagionato.

Definizione della qualità sensoriale del prosciutto stagionato DOP tramite indicatori analitici misurabili e correlazione con le caratteristiche del prosciutto fresco.

Analisi genomiche che hanno consentito l'individuazione di associazioni di polimorfismi del DNA con:

- l'attività dell'enzima endogeno Fe/Zn chelatasi (fech), coinvolto nel meccanismo di formazione del colore rosso naturale nel prosciutto stagionato DOP;
- la consistenza della parte muscolare del prosciutto stagionato DOP.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



SSICA

STABILE OPERATIVO PER L'INDUSTRIA DELLE CONSERVE AL MIEI PIÙ
FONDAZIONE DI RICERCA

Conclusioni e prospettive future



Grazie a questo progetto pilota è stato possibile identificare alcune regioni del genoma di suino che contengono dei polimorfismi del DNA associati ad alcune caratteristiche fenotipiche qualificanti per i prosciutti crudi DOP:

- attività dell'enzima Fe/Zn chelatasi (fech): colore della carne;
- altri parametri fenotipici relativi a colore e consistenza ma con un livello di significatività inferiore e senza un gene candidato presente nella regione dove mappano i polimorfismi.

I risultati di questa ricerca devono essere confermati prima di una applicazione, considerando:

- un maggior numero di animali
- altre genetiche
- altri allevamenti
- suini con genealogie (padre, madre) noti e con genotipi disponibili per poter inserire questa informazione nel modello statistico impiegato

In base ai risultati ottenuti è necessaria una caratterizzazione delle regioni risultate significative per i caratteri fenotipici qualificanti per il Prosciutto stagionato DOP (colore e consistenza), e per valutare il ruolo degli SNP identificati.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



SSICA

STAZIONE SPERIMENTALE PER L'INDUSTRIA DELLE CARNI DI ALLEVAMENTO
FONDAZIONE DI RICERCA