

Analisi del ¹⁵N della chimosina per verificare l'autenticità del caglio

Federica Camin^{1,2*}, Luana Bontempo¹, Luca Ziller¹, Pietro Franceschi¹, Aldo Molteni³, Roberto Corbella⁴, Iris Verga³

¹Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Italy

²Center Agriculture Food Environment (C3A), University of Trento, via Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italy

³Caglificio Clerici S.p.A. and Sacco S.r.l., Via Manzoni 29, I-22071 Cadorago (CO), Italy

⁴Caglio Bellucci S.r.l., Via Vito Bering 57, 41123 Modena (MO), Italy

Introduzione

Il caglio è una miscela di vari tipi di proteasi utilizzate durante la produzione del formaggio per convertire il latte in cagliata.

Il primo tipo di caglio scoperto ed utilizzato è ottenuto dalla mucosa abomasale di vitelli e ovicapri lattanti ed è chiamato caglio animale. Contiene 3 varianti genetiche di chimosina: A, B, C (10-90%) e pepsina, che sono proteasi aspartiche. In condizioni di pH e temperatura adeguate, esse scindono alcuni dei legami peptidici della caseina K del latte, in modo che la sua componente idrofila C-terminale, il caseinomacropeptide, venga rilasciata nel siero del latte. Questo provoca aggregazione delle micelle di caseina che iniziano a formare una rete di cagliata tridimensionale.

Oltre al caglio animale, sono ora disponibili sul mercato 3 tipi di coagulanti che hanno la stessa funzione del caglio, ma un costo di produzione minore. Essi sono di origine microbica, vegetale e da fermentazione da parte di microrganismi geneticamente modificati.

I coagulanti di origine microbica sono enzimi proteolitici prodotti da 3 specie fungine: *R. miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica*. Queste proteasi sono meno specifiche e presentano una minore efficacia di coagulazione, responsabile di una minore resa del formaggio e di un sapore amaro (Crabbe, 2004).

Cynara cardunculus L. subsp. *Favescens* Wiklund è la fonte più importante dei coagulanti di origine vegetale. Questi portano ad una cagliata molto morbida, non adatta per la produzione di formaggi stagionati (Jaros e Rohm, 2017).

La chimosina ricombinante o genetica è identica a quella di vitello ed è ottenuta da un microrganismo ospite in cui è espresso il gene per la proteasi. Essa è il primo prodotto alimentare realizzato utilizzando la tecnica del DNA ricombinante riconosciuto dalla FDA (Flamm, 1991). La chimosina genetica è quindi un prodotto di microrganismi geneticamente modificati (OGM), ma non contiene organismi viventi geneticamente modificati. I microrganismi utilizzati sono bacilli, lattococchi, lieviti e muffe. La chimosina genetica copre l'80% -90% del mercato di coagulanti negli Stati Uniti e nel Regno Unito (GMO Compass 2010), mentre in Francia rappresenta il 14% (Rolet-Repecaud et al., 2013).

Il caglio animale è ancora utilizzato per la produzione di formaggi tradizionali di alta qualità e prodotti DOP, IGP e STG (The Oxford Companion to Cheese, Oxford University Press, 25 ott 2016 - pagina 613) ed è obbligatorio per la produzione di formaggi DOP come Parmigiano Reggiano e Grana Padano, come richiesto nei relativi disciplinari di produzione (<https://www.granapadano.it/public/file/DisciplinareGranaPadanoDOP17-7-18ING-31101.pdf>; <https://www.parmigianoreggiano.com/it/consorzio-disciplinare-normative/>). Tuttavia, poiché la chimosina genetica agisce in modo simile alla chimosina animale, ma è molto più economica, si sospetta che possa essere utilizzata al posto del caglio animale.

Poiché l'uso di questi coagulanti alternativi non è consentito, è necessario sviluppare metodi analitici in grado di identificare l'origine della chimosina. Tra le tecniche analitiche più utilizzate in questo contesto,

c'è l'analisi dei rapporti tra isotopi stabili, che è utilizzata dai primi anni '90 come approccio ufficiale per determinare l'autenticità di diverse tipologie di alimenti, tra cui il vino, l'aceto, il miele, i succhi di frutta e più recentemente i formaggi (UNI 11692:2017).

In questo studio ci si è focalizzati sul rapporto isotopico dell'azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, espresso come $\delta^{15}\text{N}$). L'azoto di origine animale ha infatti un contenuto di ^{15}N relativamente più elevato, poiché il $\delta^{15}\text{N}$ aumenta di circa + 3 ‰ ad ogni livello trofico (Kurle and Worthy 2002), mentre il contenuto di ^{15}N della chimosina ricombinante dovrebbe essere molto più basso, perché non derivato da animali.

Abbiamo considerato 53 campioni di caglio animale autentico e 9 campioni di chimosina genetica che rappresentano la maggior parte delle tipologie di chimosina animale e genetica presenti sul mercato. I campioni sono stati raccolti a livello mondiale dal 2013 al 2018, coprendo tutti i paesi che producono le relative materie prime e considerando 5 diverse tecniche di produzione, al fine di coprire la più ampia variabilità naturale possibile.

Scopo dello studio era lo sviluppo di un metodo per estrarre la chimosina dal caglio animale, analizzare il suo $\delta^{15}\text{N}$ e compararlo con quello della chimosina genetica, per verificarne l'utilizzo come possibile marker per determinare la fonte di chimosina utilizzata nella produzione dei formaggi DOP come Grana Padano e Parmigiano Reggiano.

Materiale e metodi

Campioni

Sono stati raccolti 53 campioni autentici di caglio animale e 9 di chimosina 'genetica'. I campioni sono stati prelevati in diverse parti del mondo (Italia, Francia, Belgio, Olanda, Danimarca, Nuova Zelanda e Australia) tra il 2013 e il 2018. I campioni di caglio erano sia liquidi che in polvere, da abomaso di vitello ed erano stati prodotti utilizzando 5 diverse tecnologie di produzione. Inoltre sono stati presi in considerazione 11 campioni ottenuti mescolando il caglio animale con diverse percentuali di chimosina genetica. Un campione di caglio è stato estratto ed analizzato 8 volte per determinare la ripetibilità del metodo.

Metodi

Estrazione della chimosina dal caglio animale e dal coagulante genetico

I campioni di caglio e coagulante genetico sono stati desalinizzati mediante ultrafiltrazione, riducendo il contenuto in NaCl dal 20% al 0.5%. Il residuo è stato acidificato con HCl 15%, lasciato in frigo a 4 °C per 24 ore e filtrato con una siringa (0.45 µm). Il pH è stato aggiustato a 5.5 usando NaOH. La chimosina è stata separata dalla pepsina utilizzando una colonna a scambio anionico (resina DEAE 53) e acqua deionizzata a pH 5.5 come solvente, recuperandola poi dalla colonna con una soluzione NaCl/acqua con conduttività pari a 30-33 mS/cm² e pH di 5.5. Il percolato è stato concentrato utilizzando un sistema di ultrafiltrazione. Infine NaCl (15-18%) e sodio benzoato sono stati aggiunti come conservanti nella soluzione contenente la chimosina.

La chimosina pura è stata ottenuta da 30 ml di questa soluzione, seguendo il metodo ufficiale utilizzato per precipitare le proteine dal miele (AOAC 998.12), cioè aggiungendo 2.0 mL di NaWO₄ 10% e 2.0 mL di H₂SO₄ 0.335M in bagno-maria ad 80 °C fino a evidente flocculazione. La chimosina è stata infine liofilizzata e sottoposta ad analisi isotopica.

Analisi isotopica

Circa 1 mg di chimosina estratta da caglio o chimosina genetica sono stati pesati in microcapsule di stagno usando una bilancia microanalitica (Sartorius, Germany).

Le capsule sono state poi inserite nel campionatore automatico dell'analizzatore elementare (EA1112, Thermo Scientific) che converte l'azoto della chimosina in N₂ ed è interfacciato con lo spettrometro di massa isotopica (Finnigan DELTA XP, Thermo Scientific, Germany), che ne analizza il rapporto $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

I valori sono espressi in delta rispetto allo standard internazionale AIR secondo la seguente equazione:
$$\delta^{15}\text{N} = \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ campione} - ^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ standard})}{^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ standard}}$$

I valori delta vengono poi moltiplicati per 1000 ed espressi in 'per mille' (‰).

Ogni campione è stato analizzato 2 volte e i valori sono stati normalizzati rispetto a 2 standard di lavoro, calibrati verso gli standard internazionali USGS 40 (U.S. Geological Survey, Reston, VA, USA) e IAEA-NO3 (IAEA, Vienna).

L'incertezza di misura calcolata come 2 volte la deviazione standard, era minore di 0.3‰.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Statistica for Windows versione 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA)

Risultati e discussione

Ripetibilità

Un campione di caglio animale è stato sottoposto 8 volte all'intera procedura analitica, includendo tutte le fasi di estrazione, precipitazione ed analisi della chimosina.

Tabella 1: Ripetibilità del $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina estratta dal caglio animale

Repetition	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ vs AIR
1	6.0
2	6.0
3	5.9
4	6.0
5	6.1
6	6.1
7	5.9
8	5.9
media	6.0
dev std	0.1

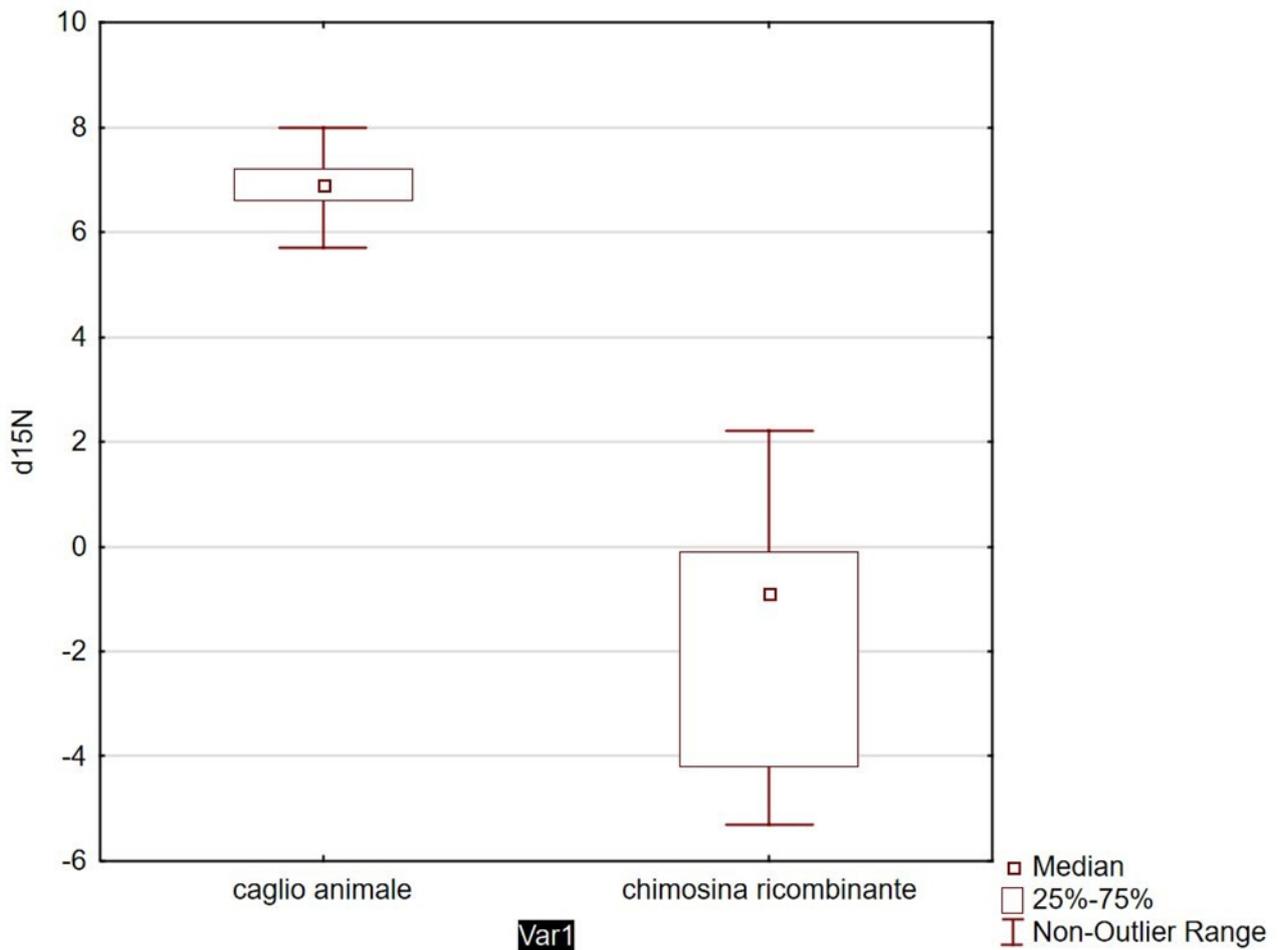
I risultati sono mostrati in Tabella 1.

La ripetibilità è ottima: la deviazione standard è paragonabile a quella strumentale, indice che le procedure di estrazione e precipitazione non causano alcun frazionamento isotopico.

$\delta^{15}\text{N}$ della chimosina

I valori $\delta^{15}\text{N}$ di chimosina da caglio animale e chimosina genetica sono rappresentati in Figura 1.

Figura 1: Box-plot dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina da caglio animale e della chimosina genetica



La Figura 1 mostra la distribuzione dei dati di $\delta^{15}\text{N}$ dei 2 gruppi (caglio animale e chimosina ricombinante) in box plot: il quadratino interno al rettangolo (chiamato box) rappresenta la mediana della distribuzione. Le linee estreme del box rappresentano il primo ed il terzo quartile, ovvero racchiudono il 50% dei valori. Le barre sotto e sopra il box indicano il valore minimo e massimo trovato per ogni gruppo.

I valori di $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina nel caglio animale risultano relativamente omogenei, compresi tra + 5.7 ‰ e + 8.0 ‰, con una media di + 6,9 ‰ e una deviazione standard di 0,5 ‰. Non si nota alcuna differenza significativa tra caglio animale in polvere e liquido o tra diverse origini geografiche o tra le 5 diverse tecnologie di produzione. D'altra parte, i valori di $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina genetica sono significativamente più bassi e con una variabilità molto più elevata, da -5,3 ‰ a + 2,2 ‰. I valori più bassi e la maggiore variabilità sono dovuti al fatto che la fonte di azoto della chimosina genetica dipende dalla composizione del mezzo di fermentazione, che può contenere composti di azoto sintetici con valori di $\delta^{15}\text{N}$ compresi tra -6 ‰ e + 6 ‰ (Bateman e Kelly 2007). Inoltre, durante la fermentazione, viene insufflata aria atmosferica, che ha valori di $\delta^{15}\text{N}$ attorno a 0 ‰, (Hellmuth e van den Brink, 2013).

La chimosina del caglio animale presenta valori più alti di $\delta^{15}\text{N}$, a causa dell'aumento di questo parametro di circa + 3 ‰ per ogni livello trofico (Kurle e Worthy 2002) e del fatto che gli animali allattati al seno hanno un ulteriore arricchimento rispetto ai valori materni (Fuller, Fuller, Harris e Hedges, 2006). La ridotta variabilità del $\delta^{15}\text{N}$ mostra che l'origine geografica, fisiologica e dietetica dell'animale e le tecnologie di lavorazione risultano poco significative per il caglio animale.

Sulla base dei valori di caglio animale, è possibile identificare un valore limite di $\delta^{15}\text{N}$ pari a +5,7 ‰ per il caglio autentico. L'aggiunta di chimosina genetica al caglio animale, o la sua sostituzione completa,

influisce sul $\delta^{15}\text{N}$ del caglio animale, in quanto ne abbassa significativamente il valore. Se il caglio animale presenta quindi un valore di $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina estratta inferiore al limite di +5.7 ‰ significa che il campione è adulterato.

I valori di $\delta^{15}\text{N}$ delle miscele risultano superiori a +5.7‰, per aggiunte di chimosina ricombinante minori al 10% (valori da 5,8 a 6,4‰) e inferiori al limite di +5.7 ‰ per aggiunte maggiori del 15% (valori da +2,7° 5,3‰). Aggiunte maggiori del 15% di chimosina ricombinante al caglio animale sono quindi facilmente identificabili.

Conclusioni

In questo studio sono stati determinati per la prima volta gli intervalli di autenticità dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ della chimosina animale (da 5,7 ‰ a 8 ‰) e della chimosina ricombinante o genetica (<2,2 ‰). Sulla base di questi risultati iniziali, possiamo concludere che il parametro $\delta^{15}\text{N}$ determinato nella chimosina è altamente efficace nel distinguere il caglio animale dalla chimosina genetica. Questo parametro è efficace anche nel determinare l'autenticità del caglio ottenuto mescolando il prodotto animale con la chimosina geneticamente modificata.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dal Caglificio Clerici e da Bellucci, produttori italiani di caglio.

Riferimenti bibliografici

Bateman, A. S., & Kelly, S. D. (2007). Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and health studies*, 43, 237-247. <https://doi.org/10.1080/10256010701550732>

Crabbe, M.J.C. (2004) Rennets: general and molecular aspects. In Cheese P.F. Foz, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, & TP Guinee (Eds.), *Chemistry. Physics and Microbiology* (pp 19-45). Amsterdam: Elsevier Applied Science.

Flamm, E.L. (1991) How FDA Approved Chymosin: A Case History, *Bio/Technology*, 9, 349–351.

Fuller, B.T., Fuller J.L., Harris D.A., & Hedges R.E.M. (2006) Detection of breastfeeding and weaning in modern human infants with carbon and nitrogen stable isotope ratios. *American Journal of Physical Anthropology*, 129, 279-293. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20249>.

Hellmuth, K., & van den Brink, J.M. (2013). Microbial production of enzymes used in food applications. In: B. McNeil, D. Archer, I. Giavasis, & L.Harvey (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (pp. 262-287). Edited by: Cambridge: Woodhead Publishing Limited

Jaros, D., & Rohm, H, (2017) Rennets: applied aspects. *Cheese: Chemistry. Physics and Microbiology*, 2017, (pp. 53-56). Elsevier.

Kurle, C.M, & Worthy, G.A.J, (2002) Stable nitrogen and carbon isotope ratios in multiple tissues of the northern fur seal *Callorhinus ursinus*: implications for dietary and migratory reconstructions *MEPS* 23:289-300 (2002) - doi:10.3354/meps236289

Rolet-Repecaud, O., Berthier, F., Beuvier, E., Gavoye, S., Notz, E., Roustel, S., Gagnaire, V., & Achilleos, C. (2013). Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 459-468. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.021>.

The Oxford Companion to Cheese, Oxford University Press, 25 Oct 2016 (p. 613)