

Valutazione del rischio per i consumatori e dell'impatto ambientale (LCA) di alimenti di origine animale prodotti in laboratorio: un approccio comparativo

Coordinatore della ricerca: prof. Pier Sandro Cocconcelli
Attività realizzata con fondi MASAF concessi con DM N. 0672678 del 20/12/2024.
Numero CUP J88H24002550007

Obiettivo

Il progetto ha eseguito uno studio indipendente per fornire informazioni scientifiche sull'efficienza della produzione di proteine del latte in fabbriche cellulari tramite fermentazione di precisione, di valutare la sicurezza alimentare e determinare l'impatto ambientale in comparazione con i sistemi di allevamento sostenibile.

Fasi della ricerca

Il progetto di ricerca è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Sviluppo di ceppi di lievito per la produzione delle proteine del latte
2. Produzione in bioreattore
3. Purificazione delle proteine eterologhe
4. Valutazione del rischio alimentare
5. Analisi dell'impatto ambientale

Risultati

1. Sviluppo di ceppi di lievito per la produzione delle proteine del latte

Si è scelto di utilizzare come sistema modello la β -caseina bovina variante A2 (β -CSN2) che costituisce circa il 30-36% delle caseine totali nel latte. Questa proteina è composta da 224 residui di amminoacidi, inclusa la sequenza segnale N terminale. La proteina matura, di massa molecolare pari a 25kDa, è composta da 209 residui e presenta 5 siti di fosforilazione su residui di serina, come riportato in figura 1.

β -casein

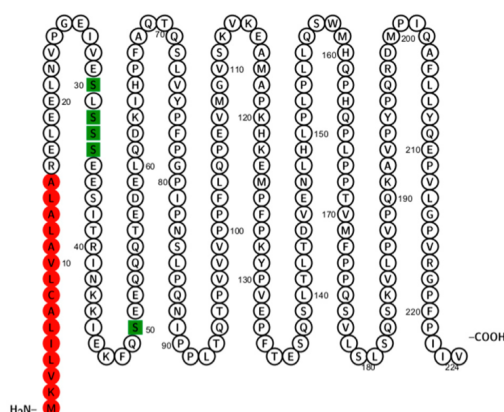


Fig. 1 rappresentazione della β -CSN2. In rosso i residui amminoacidici della sequenza segnale, in verde i siti di fosforilazione.

Sulla base della sequenza della β -CSN2 matura è stato disegnato un frammento di DNA di 627 bp, con un'ottimizzazione dei codoni per *Komagatella phaffi* (nome tassonomico aggiornato di *Pichia pastoris*), la specie di lievito utilizzata come fabbrica cellulare. Il ceppo parentale *Komagatella*

phaffi X3 appartiene ad una specie considerata QPS (Qualified Presumption of Safety) dalla Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, e quindi sicura per un uso alimentare. Per l'espressione in lievito della β -CSN2 si è impiegato il sistema Modular Cloning with OpenPichia¹, un sistema di Synthetic Biology che consente di ottimizzare l'espressione di proteine eterologhe in questo ospite microbico.

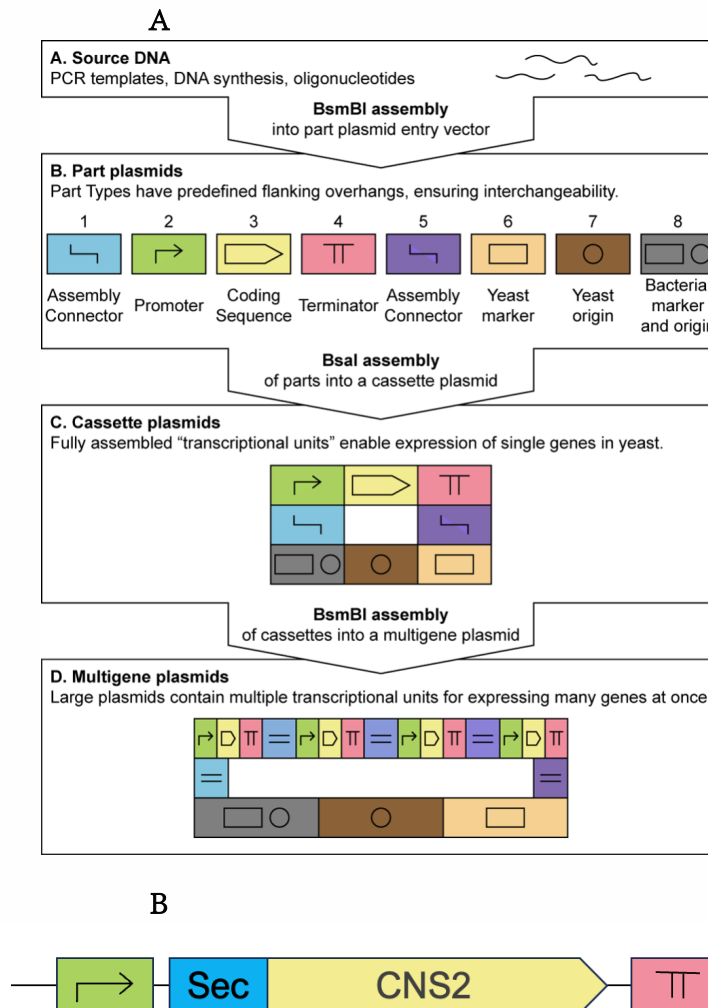


Fig. 2 A. Schema del processo di costruzione dei plasmidi vettore per la clonazione. **B.** struttura del costrutto impiegato per la trasformazione in *Komagatella phaffi* X3, in verde la regione del promotore, in blu la sequenza per la secrezioni in lievito, in giallo la regione codificante la β -CSN2 ed il rosso la regione contenente il terminatore.

Si è utilizzato il sistema di espressione considerato tra i più efficienti oggi disponibili per la produzione di proteine eterologhe tramite fermentazioni industriali², basato sull'espressione inducibile sotto il controllo del promotore *AOX1*, inducibile con metanolo, la presenza del sito KOZAC che aumenta l'efficienza della traduzione e del terminatore *AOX1*. Il gene della β -caseina, *codon optimised* per *K. phaffi*, è stato fuso nella regione N terminale con la sequenza che codifica per il fattore di secrezione α -mating, elemento che consente la secrezione della proteina nel substrato di coltura e che viene eliminato della proteina eterologa nella stessa fase di secrezione. Il plasmide vettore impiegato per l'inserzione nel locus *AOX* di *K. phaffi* (figura 3) contiene un gene di resistenza alla zeocina (bleomicina) per la selezione delle cellule trasformate che hanno acquisito il costrutto.

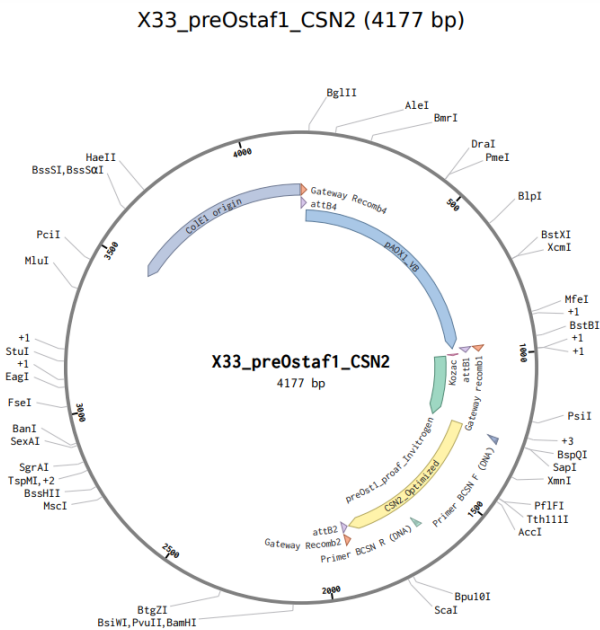


Fig. 3 Mappa del plasmide utilizzato negli esperimenti di trasformazione di *K. phaffi*

Il ceppo parentale è stato trasformato tramite elettroporazione e sono stati isolati i ceppi resistenti alla zeocina. Uno di questi, denominato X3- β CSN, è stato caratterizzato e contiene il completo costrutto inserito in uno dei cromosomi di *K. phaffi*. *K. phaffi* X3- β CSN contiene, quindi, il gene che codifica la β -CSN2 sotto il controllo di un promotore inducibile con metanolo. Si è quindi valutata la produzione in lievito della caseina bovina secreta nel mezzo di coltura. La presenza della β -CSN2 è stata dimostrata con analisi di proteine in SDS-PAGE e in Tricine-PAGE (fig. 4).

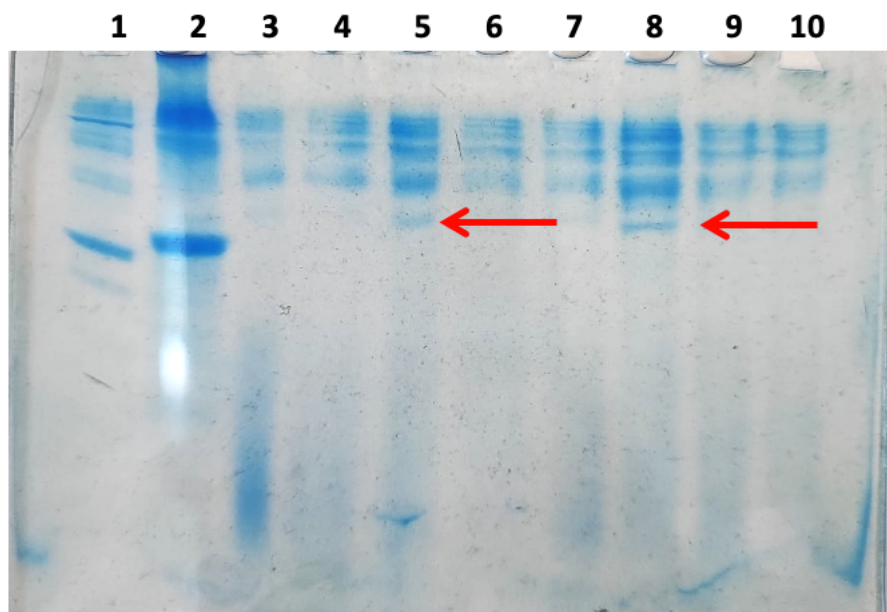


Fig. 4 Presenza della β -caseina nel brodo di coltura concentrato del ceppo *K. phaffi* X3- β CSN analizzato tramite Tricine-PAGE. La β -CSN2 è indicata dalla freccia rossa.

Per confermare la natura della proteina prodotta da *K. phaffi* X3- β CSN è stato ottimizzato il processo di produzione in batch da 1 L in beuta. La fermentazione dura di 72 ore con induzione con metanolo a partire dalle 48 ore. Le cellule sono state separate con centrifugazione e il supernatante è stato concentrato con ultrafiltrazione e liofilizzazione. Il concentrato proteico ottenuto non presenta rilevanti contaminazioni con altre proteine di *K. phaffi*, come riportato in figura 5.

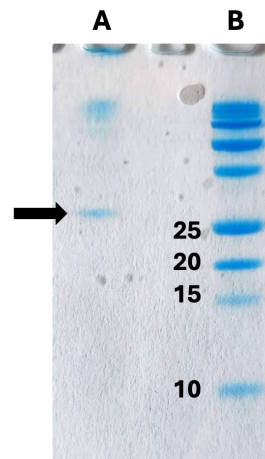


Fig. 5 Presenza della β -caseina nel brodo di coltura concentrato del ceppo *K. phaffi* X3- β CSN dopo i processi di purificazione. La β -CSN2 è indicata dalla freccia rossa

Su campioni prodotti secondo questo schema si è effettuata una analisi di Cromatografia Liquida associata con Spettrometria di Massa con Quadrupolo e valutazione del Tempo di Volo (LC-QTOF-MS), che ha confermato la natura della proteina prodotta da *K. phaffi* X3- β CSN, utilizzando come controllo la β -CSN2 pura da latte bovino, e ha consentito di effettuare una analisi quantitativa della produzione, come mostrato in figura 6.

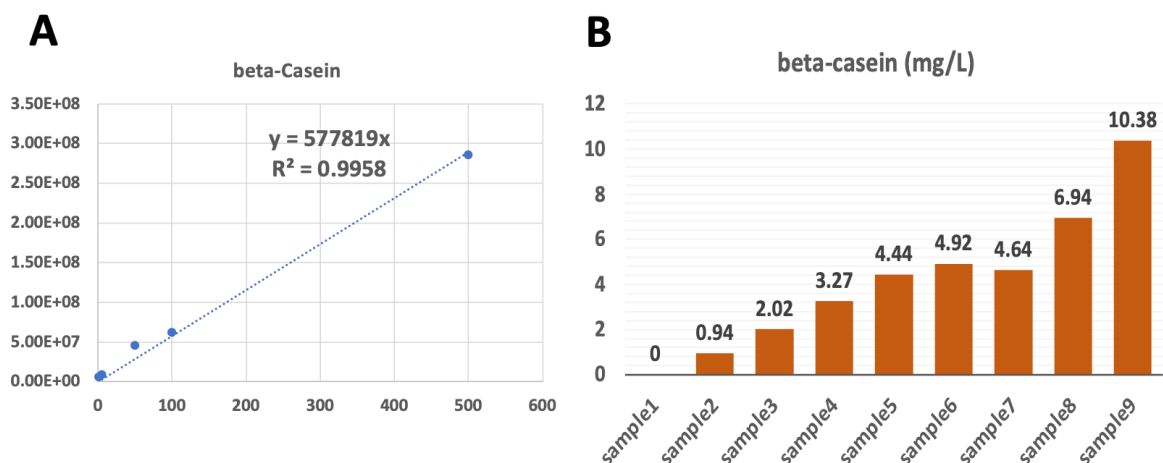


Fig. 6 Determinazione e quantizzazione della β -caseina nel brodo di coltura concentrato del ceppo *K. phaffi* X3- β CSN. **A:** retta di taratura con β -CSN2 pura da latte bovino; **B:** concentrazione di β -CSN2 da fermentazione nelle differenti fasi di crescita (sample 1-7) e di purificazione (sample 8 e 9).

2. Sviluppo Produzione in bioreattore e purificazione della β -caseina

La fase successiva è stata la coltivazione del ceppo *K. phaffii* X3- β CSN in un bioreattore da 5 -10 L. Questa strumentazione (fig. 7) è stata progettata per riprodurre a livello di impianto pilota le condizioni di fermentazione industriale.



Fig. 7 Bioreattore pilota impiegato per la produzione della biomassa di *K. phaffii* X3- β CSN.

Le condizioni di crescita e l'induzione con metanolo dell'espressione gene codificante la β -CSN2 sono state ottimizzate agendo sulla percentuale di ossigeno e sulle tempistiche di induzione e durata del processo fermentativo, con l'obiettivo di aumentare la biomassa prodotta e la produzione della β -CSN2. Il processo ottimizzato prevede una fermentazione di 72 ore totali, con l'induzione con metanolo (0.5%) nelle ultime 48 ore. Per procedere con la purificazione si è proceduto come qui riportato in sintesi:

- separazione delle cellule dal brodo tramite centrifugazione
- filtrazione del supernatante con filtri a 0.22 μ m, per eliminare le cellule residue
- ultrafiltrazione tangenziale con cut-off a 15 Kda per concentrare le proteine presenti nel brodo
- liofilizzazione

La resa massima ottenuta nel presente processo produttivo è risultata pari a circa 300 mg/L di β -CSN2 per litro di coltura, un valore inferiore rispetto ai livelli indicati in letteratura come massima resa ottenibile per la produzione di proteine eterologhe in *K. phaffii*. In particolare, i dati riportati nella letteratura scientifica mostrano una considerevole variabilità; tuttavia, per la maggior parte delle proteine eterologhe espresse mediante il sistema di espressione impiegato nel presente studio — attualmente riconosciuto come una delle più efficienti piattaforme di produzione cellulare — le rese massime per litro di coltura si collocano generalmente nell'intervallo di 1–3 g/L³.

Nonostante il rendimento osservato risulti significativamente inferiore rispetto a quello comunemente riportato per altre proteine espresse in *K. phaffii*, è in linea con quanto descritto in letteratura per l'espressione eterologa delle caseine^{4,5}. Le basse rese riscontrate sono verosimilmente riconducibili alla presenza di modificazioni post-traduzionali, in particolare alla fosforilazione della β -caseina, come già evidenziato in precedenti studi relativi all'espressione eterologa di proteine che presentano siti di fosforilazione⁶.

3. Valutazione del rischio alimentare

Per valutare la sicurezza della β -caseina prodotta da fermentazione si sono seguite le linee guida (guidances) elaborate dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). In particolare, il quadro di valutazione del rischio è definito da due documenti guida fondamentali pubblicati su EFSA Journal:

- Il primo documento (EFSA, 2025)⁷ riguarda la caratterizzazione dei microrganismi utilizzati nella produzione alimentare e fornisce indicazioni metodologiche a supporto della valutazione del rischio dei prodotti impiegati nella catena alimentare. Tale linea guida pone particolare enfasi sugli aspetti di sicurezza microbiologica e sulla valutazione delle modificazioni genetiche, includendo l'analisi dell'identità tassonomica, delle caratteristiche genetiche e fenotipiche, nonché del potenziale di patogenicità e resistenza antimicrobica.
- Il secondo documento (EFSA, 2024)⁸ definisce i requisiti scientifici per la presentazione di una domanda di autorizzazione di novel food ai sensi del Regolamento (UE) 2015/2283. Questa linea guida stabilisce i criteri per la valutazione della sicurezza degli alimenti innovativi, con particolare attenzione agli aspetti di allergenicità, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME), tossicità e all'eventuale sostituzione di alimenti tradizionali nella dieta.

Queste linee guida, nel caso di un novel food prodotto da un microrganismo geneticamente modificato, prevedono più livelli di valutazione del rischio:

- a. il primo riguarda il microrganismo impiegato, nel caso oggetto della presente si tratta di un microrganismo geneticamente modificato appartenente alla specie *K. phaffii*, un'unità tassonomica inclusa nella lista dei microrganismi con Presunzione Qualificata di Sicurezza (Qualified Presumption of Safety, QPS)⁹. Lo status QPS deriva da una valutazione preliminare che prende in considerazione i potenziali rischi per la salute umana, animale e per l'ambiente. I microrganismi inclusi in tale lista sono considerati sicuri dal punto di vista della sicurezza sanitaria; nello specifico, per *K. phaffii* si applica la qualificazione "for production purposes", che ne riconosce la sicurezza per l'impiego come fabbrica cellulare nei processi produttivi non essendo un lievito patogeno e non producendo tossine o metaboliti secondari con effetti dannosi sulla salute. Questa qualificazione richiede l'assenza del ceppo produttore nel prodotto finale. Pertanto, *K. phaffii* usata come fabbrica cellulare non pone rischi al consumatore previa dimostrazione che il prodotto finito sia privo di cellule vitali di questo microrganismo.
- b. un secondo aspetto riguarda la sicurezza del processo di modificazione genetica, che nel nostro caso ha introdotto, oltre al gene che codifica per la β -CSN2, sequenze di regolazione di lievito è un gene per la resistenza alla zeocina/bleomicina, fattore considerato un pericolo. La riduzione del rischio è connessa alla dimostrazione dell'assenza del DNA del ceppo produttore nel prodotto, nel nostro caso la β -CSN2.
- c. il terzo livello è la sicurezza del prodotto, nel nostro caso la β -CSN2 da fermentazione di precisione.

La prima determinazione sperimentale per valutare la sicurezza del prodotto è stata la verifica dell'assenza di cellule vitali del ceppo nel prodotto, mediante metodi colturali, come richiesto dalle linee guida EFSA. Le analisi sono state condotte utilizzando terreni solidi e tempi di incubazione prolungati, al fine di consentire il recupero di eventuali cellule stressate e di escludere interferenze da microrganismi contaminanti. Non sono state evidenziate cellule vitali nei lotti di produzione analizzati e quindi l'assenza del ceppo produttore nel prodotto, corrispettivo alla qualificazione "for production purposes" è rispettata.

Al fine di valutare la conformità con i criteri a. e b. si è proceduto a determinare la presenza del DNA nella β -caseina da fermentazione, seguendo la procedura suggerita dalla linea guida EFSA (2025)⁷. La presenza di DNA residuo del ceppo è stata valutata mediante PCR, utilizzando primer specifici per la regione ITS1–ITS4. Il protocollo sperimentale ha incluso controlli negativi, controlli positivi e prove di sensibilità, nonché test di "spiking" con DNA estratto dal ceppo stesso per determinare il limite di rilevabilità del metodo. I risultati mostrano l'amplificazione del target in

campioni contenenti DNA del ceppo, confermando la persistenza di materiale genetico nel prodotto (fig. 8).

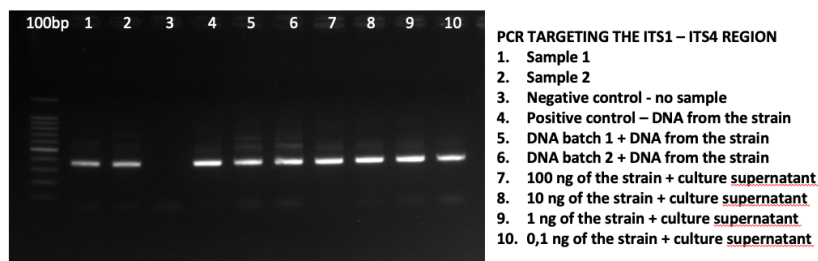


Fig. 8 Analisi di PCR per determinare la presenza del DNA di *K. phaffii* X3-βCSN nella β-caseina da fermentazione

Il ceppo porta un gene di resistenza alla zeocina e la presenza di DNA del microrganismo è risultata rilevabile nel prodotto finale. In accordo con il quadro normativo europeo, la presenza di DNA ricombinante comporta la necessità di etichettatura GMO, anche in assenza di cellule vitali nel prodotto. La zeocina è un antibiotico citotossico appartenente alla famiglia delle bleomicine, utilizzato esclusivamente come marcatore di selezione nei sistemi di espressione eterologa. Il suo meccanismo d'azione si basa sull'induzione di rotture a doppio filamento del DNA, rendendola efficace nei confronti di un ampio spettro di microrganismi e cellule eucariotiche. Tuttavia, la zeocina non è impiegata in ambito clinico, né in medicina umana né veterinaria, a causa della sua elevata tossicità e dell'assenza di un profilo di sicurezza compatibile con l'uso terapeutico. Di conseguenza, il gene di resistenza alla zeocina pur rientrando nella categoria dei geni di resistenza agli antimicrobici, non conferisce resistenza ad antibiotici di rilevanza clinica. Ciononostante, in accordo con le linee guida EFSA, la presenza di geni AMR e di DNA ricombinante nel prodotto finale deve essere attentamente valutata nell'ambito della caratterizzazione del microrganismo e della valutazione del rischio, rendendo necessaria l'implementazione di strategie di processo volte alla eliminazione del DNA residuo.

L'ulteriore fase di valutazione del rischio si è concentrata sulla natura della proteina prodotta da fermentazione. La sequenza amminoacidica è esattamente identica a quella della β-CSN2, una proteina nota per essere un allergene. Un potenziale fattore di rischio da considerare è il livello di fosforilazione, in quanto un diverso pattern di fosforilazione potrebbe modificare epitopi conformazionali e quindi alterare il riconoscimento da parte delle IgE. Tuttavia, le diverse fosforilazioni non creano nuove sequenze amminoacidiche e le evidenze scientifiche indicano che le modifiche post-traduzionali come la fosforilazione raramente aumentano l'allergenicità in modo significativo.

4. Analisi comparativa dell'impatto ambientale

Il processo fermentativo condotto ha previsto l'impiego di un volume di lavoro complessivo di circa 5 litri di soluzione nutritiva. Il ciclo produttivo, della durata operativa stimata di 90 ore, è stato realizzato in condizioni di agitazione e di aerazione continue su substrato precedentemente soggetto ad un processo di trattamento termico di sterilizzazione. In tali condizioni operative, il processo ha consentito di ottenere una resa media di circa 300 mg/L di proteina ricombinante, pari a una produzione complessiva di circa 1,5 g di proteina per lotto. A fini comparativi, si evidenzia che il latte vaccino intero presenta un contenuto medio di circa 26 g di caseine per litro. Ne consegue che per ottenere 1 g di caseine è sufficiente una quantità di circa 38 g di latte. Tale valore è stato utilizzato come riferimento per il confronto con la produzione equivalente di 1 g di caseine ottenuta per via fermentativa mediante *K. phaffii*, al fine di valutare in modo quantitativo le differenze tra la produzione naturale derivante dal latte e quella ottenuta attraverso processo

biotecnologico in bioreattore. L'analisi condotta mediante metodologia PEF 3.0, sebbene di carattere preliminare e rappresentativa dell'attuale configurazione di processo (ancora oggetto di attività di scalabilità e ottimizzazione), evidenzia che la produzione di caseina per via fermentativa presenta impatti ambientali significativamente superiori rispetto al riferimento costituito dal latte vaccino in tutte le categorie di impatto considerate. Nel confronto funzionale tra "1 g di caseina prodotta per via biotecnologica" e la "quantità equivalente di caseine ottenibile dal latte", il latte risulta sistematicamente più vantaggioso, con fattori di riduzione degli impatti variabili da circa 15 fino a 1000 volte, in funzione della specifica categoria di impatto analizzata.

5. Conclusioni

Il presente studio ha dimostrato la fattibilità tecnica della produzione di β -caseina bovina mediante fermentazione di precisione utilizzando *Komagataella phaffii* come fabbrica cellulare, consentendo l'ottenimento di una proteina strutturalmente identica alla controparte nativa del latte, con rese pari a circa 300 mg/L di brodo di fermentazione dopo 4 giorni di processo. La valutazione del rischio alimentare, condotta secondo le linee guida EFSA, ha evidenziato che il microrganismo impiegato appartiene a una specie con status QPS "for production purposes" e che il prodotto finale risulta privo di cellule vitali del ceppo produttore. Tuttavia, la rilevazione di DNA residuo contenente un gene di resistenza agli antimicrobici implica criticità di natura regolatoria, rendendo necessaria l'etichettatura come OGM o richiedendo l'implementazione di ulteriori strategie di processo per la sua completa eliminazione. Dal punto di vista della sicurezza del prodotto, non emergono evidenze di un aumento del rischio tossicologico o allergenico associato alla β -caseina prodotta per via fermentativa, sebbene il diverso pattern di fosforilazione rappresenti un elemento rilevante ai fini della comparabilità funzionale e nutrizionale. L'analisi preliminare dell'impatto ambientale ha inoltre mostrato che, nelle attuali condizioni di processo, la produzione biotecnologica di caseina presenta impatti significativamente superiori rispetto alla filiera lattiero-casearia tradizionale.



6. Riferimenti Bibliografici

- ¹ Claes K, Van Herpe D, Vanluchene R, Roels C, Van Moer B, Wyseure E, Vandewalle K, Eeckhaut H, Yilmaz S, Vanmarcke S, Çıtak E, Fijalkowska D, Grootaert H, Lonigro C, Meuris L, Michielsens G, Naessens J, van Schie L, De Rycke R, De Bruyne M, Borghgraef P, and Callewaert N. OPENPichia: licence-free *Komagataella phaffii* chassis strains and toolkit for protein expression. *Nat microb* (2024) doi: 10.1038/s41564-023-01574-w
- ² Karbalaee M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*. 2020 Sep;235(9):5867-5881.
- ³ Juturu, V. and Wu, J. (2017). Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. *ChemBioChem*, 19(1), 7-21.
- ⁴ Choi BK, Jiménez-Flores R. Expression and purification of glycosylated bovine beta-casein (L70S/P71S) in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*. 2001 Apr;49(4):1761-6.
- ⁵ Kim, Y. K., Yu, D. Y., Kang, H. A., Yoon, S., & Chung, B. H. (1999). Secretory Expression of Human alpha-Casein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 9(2), 196-200.
- ⁶ Cai, H., Deng, J., Li, J., Ma, M., Huang, C., Zhao, P., ... & Zhang, L. (2019). Modulating the 3' end-dna and the fermentation process for enhanced production and biological activity of porcine interferon-gamma. *Plos One*, 14(3), e0214319
- ⁷ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9705>
- ⁸ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.8961>
- ⁹ <https://zenodo.org/records/15827398>