



Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali

DIPARTIMENTO PER LA SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA, LA NUTRIZIONE E LA
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Segretariato nazionale della valutazione del rischio della catena alimentare

COMITATO NAZIONALE PER LA SICUREZZA ALIMENTARE

PARERE N. 1 DEL 17/07/2008

Lisozima nel Grana Padano

Inquadramento

I dati di contesto di maggior rilevanza appaiono i seguenti:

1. a seguito della nota datata 13 novembre 2007 - della DG sicurezza alimentare e nutrizione (nel seguito individuata come “Gestore”), il Segretariato nazionale per la valutazione del rischio della catena alimentare ha richiesto un parere in merito alla presenza di lisozima nel Grana Padano DOP all’Istituto superiore di sanità e a questo Comitato;
2. il Grana Padano¹ è un formaggio a pasta dura, cotta, a lenta maturazione e a lunga stagionatura (10-24 mesi ed oltre), prodotto da latte vaccino crudo, riposato e parzialmente scremato per affioramento. La pasta, tipicamente granulosa, è di color bianco paglierino e presenta fratture a scaglie. L’occhiatura, normalmente assente o poco visibile, quando presente, è sparsa nella pasta ed è di piccolissime dimensioni;
3. la tecnologia di produzione del Grana Padano DOP è antica e, pur mantenendo sostanzialmente intatti i suoi caratteri originali, si è costantemente evoluta, in particolare nel corso del secolo scorso, con la introduzione dell’impiego di:

¹ Il Grana Padano è un formaggio tutelato e riconosciuto DOP [Regolamento (CE) N. 1107/96 della Commissione del 12 giugno 1996, relativo alla registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all’articolo 17 del Regolamento (CEE) n. 2081/92 del Consiglio Reg. n. 1107/96/CE e Reg. n. 510/2006/CE; Regolamento (CE) N. 510/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006, relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d’origine dei prodotti agricoli e alimentari]. La zona di produzione del formaggio è un’area specifica della Valle Padana e del Nord Italia (Province di Alessandria, Asti, Biella, Cuneo, Novara, Torino, Verbania, Vercelli, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Lecco, Lodi, Mantova a sinistra del Po, Milano, Monza, Pavia, Sondrio, Varese, Trento, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza, Bologna a destra del Reno, Ferrara, Forlì Cesena, Piacenza, Ravenna, Rimini); con riferimento alla produzione di latte, la zona di origine si estende anche ad alcuni Comuni della provincia autonoma di Bolzano (Anterivo, Lauregno, Proves, Senale-S, Felice e Trodena).

La produzione di Grana Padano DOP è sottoposta alla tutela del relativo Consorzio con sede a Desenzano ed al controllo del CSQA, in base alla legge 21 dicembre 1999, n. 526, a titolo: “Disposizioni per l’adempimento di obblighi derivanti dall’appartenenza dell’Italia alle Comunità europee - Legge comunitaria 1999”.

- a. colture lattiche specifiche (siero innesto) per la produzione e maturazione del formaggio;
 - b. lisozima, alla fine degli anni ottanta², per il contenimento dei difetti microbici e, soprattutto, del gonfiore tardivo³;
4. con DM 27 febbraio 1996, n. 209, a titolo: “Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CE, n. 4/35/CE, n. 94/36/CE, n. 95/2/CE e n. 95/31/CE”, è stata autorizzata la pratica dell’impiego del lisozima come additivo alimentare nella produzione dei formaggi stagionati alla dose “quanto basta”;
 5. il disciplinare per la produzione del Grana Padano DOP⁴, all’articolo 5 ammette “l’uso di lisozima, tranne che per il Trentingrana, fino ad un massimo di 2,5 grammi per 100 chilogrammi di latte⁵”;
 6. il lisozima è un polipeptide lineare costituito da 129 amminoacidi, che si ottiene dall’albume d’uovo di gallina, usualmente sotto forma di cloridrato;
 7. l’allergia alle uova è annoverata tra le più frequenti nella popolazione; sono state descritte reazioni cliniche al lisozima contenuto nell’uovo; sono stati descritti pochi casi di reazioni allergiche conseguenti all’assunzione di formaggi contenenti lisozima in soggetti allergici alle uova (Request EFSA-Q-2004-130 del 22 febbraio 2005); ad analoghe conclusioni è pervenuto l’Istituto superiore di sanità con nota pervenuta il 21 aprile 2008 (Allegato I);
 8. ai sensi del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, e successive modifiche ed integrazioni, a titolo: “attuazione delle direttive n. 89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l’etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari”, tra gli allergeni alimentari sono ricompresi le uova e i prodotti derivati; questi ultimi “qualora utilizzati nella fabbricazione di un prodotto alimentare e presenti anche se in forma modificata debbono figurare in etichetta col nome dell’ingrediente da cui derivano”;
 9. il lisozima può essere impiegato oltre che nel Grana Padano DOP anche nella produzione di altri formaggi (Provolone, Montasio, Asiago)⁶. La questione del rischio allergico andrebbe dunque vista in un’ottica più generale.

² Per un certo periodo, per raggiungere la finalità in questione è stata impiegata l’aldeide formica, pratica abbandonata all’inizio degli anni novanta in favore dell’uso di lisozima.

³ Nella microflora presente naturalmente nel latte, accanto a microrganismi lattici omofermentanti possono essere presenti in varia misura microrganismi responsabili di fermentazioni gasogene quali, in ordine di importanza:

- ◆ alcune specie di clostridi (*Cl. tyrobutyrricum*; *Cl. spororogens*, *Cl. butyricum*);
- ◆ batteri propionici;
- ◆ colibatteri;
- ◆ batteri lattici eterofermentanti.

La produzione di gas determina la formazione di vacuoli (gonfiore tardivo) nella struttura della pasta del formaggio che ne deprezzano gravemente il valore commerciale, anche perché spesso questa alterazione si accompagna all’insorgenza di sapori ed odori indesiderati dovuti ad altri processi fermentativi.

Un ruolo rilevante nelle fermentazioni gasogene è svolto soprattutto dal *Cl. tyrobutyrricum* che utilizza l’acido lattico, prodotto dall’attività fermentativa a carico del lattosio dalla microflora lattica, per dare origine ad acido butirrico, anidride carbonica ed idrogeno.

⁴ DM 20 luglio 2006, concernente la “protezione transitoria accordata a livello nazionale alla modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta <<Grana Padano>> registrata con Regolamento (CE) n. 1107/96 della Commissione del 12 giugno 1996”, e successive modificazioni.

⁵ All’incirca nel 96% del Grana Padano DOP prodotto si è fatto uso di lisozima.

⁶ Già con DM 1° agosto 1983, di “aggiornamento del DM 31 marzo 1965, concernente la disciplina degli additivi chimici consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari”.

Valutazione del rischio

1. Caratterizzazione del lisozima

Una scheda tecnica sul lisozima è riportata in Allegato II.

La finalità d'uso del lisozima nella produzione dei formaggi stagionati in Italia è prevalentemente quella di controllare l'insorgenza di fermentazioni anomale con produzione di gas che può costituire per alcuni formaggi un grave problema.

La tecnica di alimentazione delle vacche da latte è, infatti, basata sull'impiego di insilati⁷, soprattutto di mais. Negli insilati i clostridi sono presenti in misura rilevante e tale circostanza favorisce sia la diffusione delle forme sporigene nell'ambiente delle stalle sia la presenza nella microflora del latte di spore di alcune specie in particolare (es. *Cl. tyrobutyrricum*; *Cl. spororogens*, *Cl. butyricum*). Grazie alla sua attività enzimatica, il lisozima:

- ◆ esercita una funzione di modulazione dell'attività della microflora con effetti non favorevoli alla germinazione delle spore dei clostridi, prevalentemente del *Cl. tyrobutyrricum*.
- ◆ è in grado di idrolizzare i legami β (1-4) tra l'acido N-acetilmuramico e la N-acetilglucosamina nelle membrane esterne di varie specie batteriche, in particolare in organismi gram positivi.

Il lisozima, in sintesi, è in grado di controllare lo sviluppo di fermentazioni indesiderate a condizione che la contaminazione dai microrganismi responsabili sia relativamente contenuta e la sua attività può essere assimilata a quella di un "modulatore dei processi fermentativi" analogamente a quanto svolto da una corretta acidificazione della pasta, garantita dal siero innesto, e da una adeguata gestione della temperatura e dell'umidità nella lunga fase di stagionatura e non ad un funzione di conservante come invece il sale.

Le caratteristiche chimico-fisiche ed i requisiti di purezza del lisozima utilizzato a fini alimentari sono state specificate nel citato DM 1° agosto 1983.

2. Stima dell'esposizione

Il lisozima aggiunto al latte si lega, per una quantità stimata attorno al 80%, alla caseina [De Roos A.L., Walstra P., Geurts T.J. – *The association of lysozyme with casein* – Int. Dairy J. 8, 319-324 (1998)]; gran parte del lisozima, quindi, si ritrova nel formaggio.

Nei formaggi che nel corso della caseificazione sono stati addizionati di lisozima la molecola si ritrova analiticamente anche dopo lunghi periodi di stagionatura ma scarse sono le informazioni sui livelli della sua effettiva presenza. Questa carenza d'informazioni è stata recentemente evidenziata anche dal Panel on Nutrition dell'EFSA (Request EFSA prima citata), il quale – in carenza di dati analitici – ha affermato, da una parte, che *si stima che il lisozima contenuto nel formaggio sia pari a circa 250-400 mg/kg di prodotto in dipendenza del tipo di formaggio e del processo di produzione* e, dall'altra, che *non sono disponibili dati analitici sui residui di lisozima effettivamente riscontrati sul prodotto finito*. A suo tempo, il più volte citato DM 1° agosto 1983 aveva stabilito che *il residuo dell'enzima nel formaggio non dovesse, comunque, superare i 300 mg/kg di prodotto*.

⁷ L'impiego degli insilati di mais è motivato dal fatto che è la coltivazione che consente di ottenere, stante le condizioni agro-climatiche, una elevata produzione di foraggio di buona qualità, a costi relativamente contenuti, facilmente conservabile con la tecnica dell'insilamento, molto appetibile e che consente elevate produzioni di latte. Anche il latte destinato all'uso alimentare diretto, compreso quello ad "alta qualità", è ottenuto da bovine secondo le modalità su indicate.

Nelle aree nelle quali non è ammesso l'impiego degli insilati, come nel Trentino, il problema si pone in misura minore; in quelle zone non è autorizzato l'utilizzo del lisozima.

I consumatori abituali di formaggi in Italia sono pari all'incirca al 26,7% della popolazione superiore a tre anni d'età⁸: sulla base delle tavole demografiche ISTAT 2007, detta popolazione superiore a tre anni di età di consumatori giornalieri di formaggio risulta essere pari a 15.352.500 persone. Non è invece noto il numero delle persone che fanno saltuariamente uso di formaggio nella dieta. Parimenti, non è noto il numero delle persone che fanno uso giornaliero o saltuario di Grana Padano DOP nella dieta.

A corollario di tali informazioni si può aggiungere che:

- ◆ il consumo domestico di formaggi in Italia è pari all'incirca a 28 gr/die/persona⁹. Tale dato è sufficientemente coerente al range di valori di cui allo studio EPIC, preso in considerazione anche dalla Request EFSA prima citata [per l'Italia: 34-55 gr/die/persona];
- ◆ ogni anno si producono oltre 4.000.000 di forme di Grana Padano DOP (media degli ultimi 4 anni: 4.296.879 forme con un peso medio di circa 36-37 kg) un quarto delle quali destinate all'esportazione (nel 2007 la quota destinata al mercato estero è valsa 26,73%). Il consumo nazionale complessivo di Grana Padano DOP è pari a circa 1,3 kg/anno/persona; il solo consumo domestico vale invece all'incirca 0,9 kg/anno/persona¹⁰.

3. Valutazione degli effetti dell'esposizione

Alle proteine dell'uovo sono notoriamente attribuite proprietà allergeniche in soggetti sensibili. Le proteine ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucoide e lisozima sono classificate come Gal d1-d4 secondo la nomenclatura degli allergeni (Poulsen LK, Hansen TK, Norgaard A, Vestergaard H, Stahl Skov P, Bindslev-Jensen C. Allergens from fish and egg. Allergy. 2001; 56 Suppl 67:39-42.).

L'allergia alle uova è annoverata tra le più frequenti nella popolazione; sono state descritte reazioni cliniche al lisozima contenuto nell'uovo; sono stati descritti pochi casi di reazioni allergiche conseguenti all'assunzione di formaggi contenenti lisozima in soggetti allergici alle uova (Request EFSA-Q-2004-130 del 22 febbraio 2005).

Non risultano segnalazioni di allergie legate alla presenza di lisozima nel Grana Padano DOP.

La stessa EFSA evidenzia la necessità di acquisire informazioni più accurate in merito ai livelli di presenza del lisozima negli alimenti additivati e, soprattutto, alle risposte indesiderate in gruppi di popolazioni vulnerabili attraverso l'effettuazione di studi mirati. Nell'intento di contribuire a ridurre questa carenza di informazioni si colloca la ricerca accettata per la pubblicazione (Journal of American College of Nutrition, 2008. Absence of Allergic Reaction to Egg White Lysozyme Additive in Grana Padano Cheese - Iacomelli et al.) che evidenzia che "la quota di lisozima assorbita con il formaggio è globalmente molto bassa, sebbene sia stata significativamente più bassa nei controlli che nei pazienti allergici, nel 15% dei quali è indotto un aumento delle IgE RAST, senza reazioni cliniche¹¹.

⁸ Indagine "Multiscopo" dell'ISTAT sulle famiglie – 2003.

Il dato è riferito ai consumatori che almeno una volta al giorno mangiano una porzione di formaggio.

⁹ Elaborazione di dati d'acquisto ISMEA-AcNielsen.

¹⁰ Elaborazione di dati d'acquisto ISMEA-AcNielsen.

¹¹ L'osservazione di una aumentata quantità dell'assorbimento del lisozima osservata nei soggetti atopici riflette la situazione di aumentata permeabilità intestinale para-fisiologica osservabile in questi soggetti.

Si tratta di un contributo che va approfondito, ampliando la casistica e estendendola anche ai soggetti in età pediatrica. Nei bambini allergici, infatti, la allergia a maggior incidenza è quella alle uova che si presenta nel 31% dei casi [(nei bambini con allergie alimentari) rispetto all'8% degli adulti, sempre con allergie alimentari] (Fremont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. Allergy. 1997;52:224-8.).

4. Caratterizzazione del rischio

Allo stato attuale delle conoscenze e dei dati disponibili, se, in ogni caso, non si può escludere che soggetti sensibili possano manifestare reazioni allergiche secondarie all'assunzione di formaggi contenenti lisozima, il rilievo che non sia riportato in letteratura nemmeno un caso di allergia legato alla presenza di lisozima nel Grana Padano DOP fa ritenere molto basso tale rischio.

Sarà possibile una caratterizzazione quantitativa del rischio a condizione che si possa disporre di dati più completi sui livelli di esposizione e sui relativi effetti, con particolare riguardo alla popolazione in età pediatrica.

Quanto appena detto per il Grana Padano DOP deve intendersi esteso a tutti i formaggi addizionati con lisozima.

Allo stato, si raccomanda al Gestore la messa in atto di ogni intervento utile a favorire la scelta consapevole del consumatore e, in particolare, di quella quota dei consumatori allergici alle proteine dell'uovo.

A tal fine sembrerebbe più corretto e più facilmente rilevabile da parte del consumatore la seguente dicitura in etichetta: "Ingredienti: latte, sale, caglio, lisozima da uovo" oppure "Ingredienti: latte, sale, caglio, lisozima-proteina dell'uovo".

In questo modo le persone sensibili alle proteine dell'uovo sarebbero correttamente informate.

IL PRESIDENTE DEL CNSA
(Dr. Aldo Grasselli)

ROMA 17 Luglio 2008