Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

Assegno di Ricerca (AdR1612/11)

Nome e Cognome del Beneficiario	Tiziana Passuello
Titolo del Programma di Ricerca	*"Determinazione della persistenza di residui di coadiuvanti proteici potenzialmente allergizzanti in seguito a trattamenti di chiarifica dei vini".*
Settore Scientifico Disciplinare di riferimento	AGR/15
Nome e Cognome del Responsabile Scientifico	Barbara Simonato
Durata dell'Assegno di Ricerca (da…a…)	01/05/2011 – 30/04/2012
Periodo di riferimento della relazione (da…a…)	01/05/2011 – 30/04/2012
Note *(es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, etc.)*	-

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (***presupposti/obbiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi e conclusivi, discussione***)

La chiarifica del vino è un processo volto a rimuovere alcune sostanze indesiderate, come alcuni composti fenolici presenti nella bevanda, al fine di evitare la precipitazione colloidale e per migliorare le caratteristiche organolettiche quali: ridurre l'amarezza e l'astringenza (Yokosuka e Singleton, 1995). Tale procedimento avviene comunemente tramite aggiunta di proteine al vino come la gelatina, colla di pesce, caseina del latte e albumina dal bianco d'uovo (Boulton, Singleton, Bisson, e Kunkee, 1996). Queste proteine interagiscono con i polifenoli per formare complessi che vengono eliminati dal vino per decantazione, centrifugazione o filtrazione. Tuttavia, la completa eliminazione di tali proteine non è totalmente certa e poichè alcuni di questi agenti chiarificanti, come le caseine del latte e le proteine dell'uovo, sono allergizzanti per alcuni soggetti, la loro permanenza, anche in traccia, nel prodotto finito può rappresentare un rischio per la salute di questi consumatori.

L'unione Europea ha adottato la Direttiva 2003/89/EC e successivo emendamento (Direttiva 2007/68/EC) che elenca una serie di sostanze allergiche incluse latte, uova e loro derivati, che devono essere dichiarati in etichetta quando sono aggiunti ai cibi come ingredienti. Anche paesi come l'Australia, la Nuova Zelanda e gli Stati Uniti hanno introdotto regolamenti simili.

Tuttavia la necessità di dichiarazione in etichetta qualora queste sostanze siano aggiunte come coadiuvanti tecnologici durante la vinificazione è temporaneamente sospesa per mancanza di dati scientifici concernenti l'effettiva presenza di residui nel vino finito (Direttiva 2000/13/EC, Direttiva 2003/89/EC, Direttiva 2005/26/EC, Direttiva 2007/68/EC, Regolamento UE 2010/1266).

Molti vini rossi, ricchi in tannini, sono trattati con bianco d'uovo a scopo chiarificante; i vini bianchi sono invece trattati spesso con caseine di latte ad effetto illimpidente e brillantante. I dosaggi mediamente utilizzati vanno normalmente da 5 a 15g/hL. Inoltre, i trattamenti tecnologici che subiscono questi agenti chiarificanti durante la loro preparazione sono modesti, pertanto gli epitopi delle proteine rimangono inalterati e quindi attivi (Mine & Zhang, 2002), rappresentando potenzialmente un rischio per i soggetti allergici (EFSA Report, 2007). Pertanto si rendono necessari metodi analitici sensibili ed accurati per l'eventuale rilevazione di tracce di chiarificante nel prodotto finito. I sistemi finora utilizzati, erano sistemi immuno-enzimatici, in particolare l'ELISA, sistema raccomandato da anche Office International de la Vigne et du Vin (OIV) (Resolution OIV/OENO 427/2010). Questo metodo ha, in generale, una buona sensibilità ed è relativamente semplice da usare ma risente delle sostanze interferenti presenti nel vino rosso, specie le sostanze fenoliche.

Per superare questo tipo di problema, abbiamo messo a punto un sistema di estrazione di proteine da vini bianchi e rossi (questi ultimi presentano notevoli difficoltà nella lavorazione dal momento che sono ricchi di sostanze polifenoliche e polisaccaridiche), per la rilevazione diretta di proteine allergizzanti mediante successiva analisi con

spettrometria di massa (LC/MS/MS).

A tale scopo le proteine del vino, sono state estratte in seguito a precipitazione con il metodo del Potassio Dodecil Solfato (KDS) e succesivamente analizzate. Brevemente, al vino è stato aggiunto sodiododecilsolfato (SDS) 10% (w/v) ad una concentrazione finale dello 0,2% (w/v). I campioni così ottenuti sono stati poi riscaldati in acqua bollente per 10 min. E' stato in seguito addizionato KCl 2 M in modo da raggiungere una concentrazione finale di 400 mM. I campioni sono stati lasciati in agitazione per 45 minuti a 4 °C ed in seguito il pellet, formato dal complesso KDS-proteina è stato recuperato per centrifugazione a 14000 g per 15 minuti a 4 °C. Il pellet ottenuto è stato lavato con acido tricloroacetico ed in seguito con acetone, al fine di eliminare il sodiododecilsolfato, che avrebbe interferito con l'analisi in LC/MS/MS.

I campioni così ottenuti sono poi stati analizzati mediante LC-MS/MS.

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO (*eventuale*)

-

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA (***eventuale***)
-

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA (***eventuale***)
-
SEMINARI/CONFERENZE TENUTI
-

RISULTATI DELLA RICERCA (***pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.***)

Dopo studi iniziali che prevedevano l'estrazione di proteine da vini chiarificati nel nostro laboratorio e l'utilizzazione di metodi immunochimici (immunoblotting, dot blot) per la rilevazione di proteine di chiarificante aggiunto (proteine di latte e di uovo), utilizzando anticorpi specifici; si è proceduto alla messa a punto di un metodo più accurato e sensibile per la detection di proteine in tracce.

Tale metodo è stato dapprima messo a punto utilizzando vini rossi e bianchi chiarificati nel nostro laboratorio, dopo avere ottenuto incoraggianti risultati, sono stati analizzati, 25 vini commerciali (12 rossi, 12 bianchi ed un rosè) che ci ha permesso di rivelare tracce di proteine di chiarificante, nel prodotto commerciale. In particolare, in 8 vini sono state rilevate proteine allergizzanti da uovo o da latte. L'ovoalbumina, il maggior allergene dell'uovo, è stato ritrovato in 8 vini, 2 di questi contenevano anche alfa e beta caseine di latte. L'ovotransferrina è stata ritrovata in 2 vini.

Il metodo di preparazione del campione, ossia l'estrazione di proteine dalla matrice, si è rivelato quindi adatto a tutte le tipologie di vino (bianco, rosso, rosè) e permette l'identificazione delle proteine con un buon livello di attendibilità. Essendo un sistema che prevede estrazione proteica e analisi in massa, eliminando il passaggio dell'elettroforesi, si presenta relativamente semplice e veloce e quindi applicabile al vino per la sicurezza e la tutela dei consumatori allergici.

Il Responsabile Scientifico _____

L'Assegnista di Ricerca _____

(Firma)