

METODO ELISA AUTOMATIZZATO PER UNA RAPIDA VALUTAZIONE DELLA PRESENZA/ASSENZA DI LISOZIMA NEL VINO

Laura Barp *, Alex Carlà, Mario Malacarne, Roberto Larcher

Fondazione Edmund Mach – Centro Trasferimento Tecnologico, Via E. Mach, 1, 38010, S. Michele all'Adige (TN) – ITALY

*Autore corrispondente: laura.barp@fmach.it

Introduzione

Da ormai molti anni, il lisozima è ampiamente utilizzato nelle cantine in alternativa all'anidride solforosa come agente antimicrobico per il controllo delle popolazioni di batteri lattici nei vini bianchi e rossi, o anche per ritardare, o inibire del tutto, la fermentazione malo-lattica durante la fermentazione alcolica. L'azione di questo enzima a basso peso molecolare (circa 14.3 kDa) risiede specificamente nella capacità di idrolizzare la parete cellulare dei batteri Gram-positivi (Bartowsky *et al.*, 2004). Tra gli obiettivi di maggiore interesse tecnologico vi è sicuramente quello di diminuire l'impiego di anidride solforosa, sebbene il lisozima non possieda proprietà antiossidanti e antimicrobiche specifiche verso i batteri Gram-negativi e i lieviti, e non abbia alcun effetto sulla protezione o il miglioramento del flavour del vino (Liburdi *et al.*, 2014). Il controllo del livello di acidi volatili e di ammine biogene è un altro dei vantaggi non trascurabili derivanti dall'utilizzo di tale enzima in vinificazione.

L'utilizzo in vinificazione di lisozima ricavato dal bianco d'uovo è stato approvato dall'Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino (OIV) nel 1997 e, in base al Reg. CE 2066/2001, la quantità massima utilizzabile è di 50 g/hL. Con il regolamento di esecuzione UE 579/2012 del 29 giugno 2012 (modifica del regolamento della Commissione 607/2009), entrato in vigore il 1° luglio 2012, è stato stabilito che i vini trattati con additivi allergenici quali uova, latte e i loro derivati, nonché i solfiti, siano sottoposti a un'etichettatura specifica "se la loro presenza può essere rilevata nel prodotto finale". Mentre per i solfiti la presenza a concentrazioni superiori ai 10 mg/L doveva essere dichiarata in etichetta già da alcuni anni (art. 8 comma 1 del decreto legislativo 114/2006, recepimento della direttiva 2003/89/CE), la novità introdotta dal Reg UE 579/2012 ha riguardato l'eventuale residualità di coadiuvanti proteici, quali caseina e albumina (utilizzati in enologia come agenti chiarificanti), ma anche l'eventuale presenza di lisozima. L'indicazione in etichetta va riportata qualora tali allergeni siano rilevati nel vino utilizzando un metodo caratterizzato da un limite di rilevabilità di 0,25 mg/kg (OIV-COMEX 502-2012). I produttori si sono dovuti, quindi, fare carico dei controlli analitici per la ricerca degli eventuali residui di allergeni nei vini all'imbottigliamento al fine di tutelare la sicurezza dei soggetti allergici, cercando però, allo stesso tempo, di non penalizzare, attraverso un'etichettatura che potrebbe rappresentare un deterrente all'acquisto, quei vini che effettivamente non comportano rischi per la salute del consumatore.

Come metodo di riferimento per la ricerca di residui allergenici in vino, l'OIV propone un approccio immunoenzimatico ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) che sfrutta la specificità di reazione fra allergene (antigene) e anticorpo, il cui legame viene quantificato mediante reazione colorimetrica (Lacorn *et al.*, 2011); come eccezione, per il lisozima vengono invece proposti tre metodi ufficiali, due dei quali utilizzano la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con detector fluorimetrico (FLD) (OIV-MA-AS315-25; OIV-MA-AS315-14) mentre il terzo sfrutta l'elettroforesi su gel (OIV-MA-AS315-24). Si ritiene, infatti, che per il lisozima sia preferibile utilizzare un metodo analitico non basato sull'attività enzimatica, poiché questa potrebbe essere inibita da fenomeni di parziale denaturazione, formazione di complessi o di co-precipitazione (Riponi *et al.*, 2007).

Sono già disponibili sul mercato kit commerciali per la quantificazione del lisozima in vino con metodo ELISA, analoghi a quelli proposti per la ricerca dei residui di caseina e ovoalbumina. La possibilità tuttavia di ricercare con una medesima tecnica ELISA multiparametrica completamente automatizzata l'eventuale presenza di tutti i possibili allergeni derivanti da uovo e latte costituirebbe un auspicabile obiettivo per tutti i laboratori di controllo qualità, soprattutto per gli aspetti legati all'ottimizzazione dei tempi e dei costi analitici.

In questo lavoro si è voluto pertanto confrontare i risultati ottenuti con due differenti approcci, cromatografico (HPLC-FLD) e immunoenzimatico automatizzato (ELISA), sia su vini bianchi non trattati che su vini addizionati di lisozima a livelli da 0,1 a 10 mg/L, focalizzando l'attenzione non solo sulle caratteristiche prestazionali dei diversi metodi, ma anche su considerazioni relative ai tempi e costi di impiego e sulla possibilità di utilizzare il test ELISA come approccio per uno screening rapido sulla presenza/assenza di tale enzima in vino.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato realizzato solo su vini bianchi, poiché maggiormente soggetti all'utilizzo tecnologico di lisozima al fine di inibire la fermentazione malo-lattica e per la maggiore solubilità dell'enzima in questo tipo di vini, che li porta ad avere residui maggiori rispetto ai rossi. Per la sperimentazione sono stati raccolti 40 vini bianchi (considerati ragionevolmente privi di contaminazione da residui di lisozima) provenienti da differenti zone d'Italia e di diverse annate e varietà: Chardonnay (N=8), Frascati (1), Gewürztraminer (5), Grillo (2), Moscato (1), Müller Thurgau (3), Pinot Bianco (1), Pinot Grigio (10), Prosecco (2), Sauvignon (3) e vino bianco generico (4). I vini sono stati suddivisi in 5 gruppi (8 per ciascun gruppo) aggiunti di concentrazioni differenti di lisozima (0,1 - 0,5 - 2,0 - 5,0 e 10 mg/L) e due campioni di vino per gruppo sono stati preparati in doppio, per un totale di 50 campioni, come riportato in Tabella 1.

Per l'approccio cromatografico, la procedura analitica di riferimento è stata quella proposta dall'OIV (OIV-MA-AS315-14, 2007), realizzata in HPLC-FLD (Agilent 1200, Santa Clara, CA) su colonna TSKgel® Phenyl-5PW (7,5 cm x 4,6 mm, 10 µm, Tosoh Bioscience, Tokyo, Giappone) e permette la quantificazione del lisozima presente in vino rosso e bianco, previa acidificazione a pH 2 e filtrazione (Riponi *et al.*, 2007). L'apporto di alcune piccole modifiche al flusso (0,8 mL/min) e al gradiente di eluizione (100 % di acqua/acetonitrile/acido trifluoroacetico 98,8/1/0,2 (v/v/v) da 0 a 4 min, nei successivi 9 min si aggiunge il 35 % di acetonitrile/acqua/acido trifluoroacetico 70/29,8/0,2 (v/v/v), mantenuti in isocratica per 6 min, e un ulteriore aumento fino al 52 % in 25 min, cui seguono 9 min di lavaggio e ricondizionamento della colonna) ha favorito l'eluizione del lisozima in una zona del cromatogramma (intorno ai 40 minuti) particolarmente libera da molecole interferenti, permettendo così un aumento della sensibilità dell'analisi.

Il test ELISA è stato realizzato utilizzando un analizzatore automatico (PersonalLAB™, Adaltis s.r.l., Guidonia Montecelio, Roma) e un kit ad alta sensibilità (Astori s.n.c., Poncarale, Brescia) per la determinazione quantitativa di lisozima in formaggio, alimenti e vini, basato sul principio "sandwich" (reazione immunochimica con un anticorpo specifico). Il kit comprende 96 pozzetti la cui superficie interna è rivestita dall'anticorpo specifico anti-lisozima, 5 soluzioni standard di lisozima a diversa concentrazione (0 – 25 – 50 – 125 – 250 µg/L), il tampone di estrazione dei campioni (concentrato 10x), la soluzione di lavaggio (concentrata 10x), l'enzima coniugato, il substrato enzimatico e la soluzione bloccante (contenente H₂SO₄). Prima dell'analisi, 0,5 mL di ogni campione (o campione opportunamente diluito) è stato aggiunto di 9,5 mL dell'apposito tampone di estrazione e omogeneizzato 15 sec circa per agitazione.

Tabella 1. Vini bianchi selezionati per la sperimentazione e rispettive aggiunte di lisozima.

Tipologia	Origine	Annata	Aggiunta di lisozima (mg/L)
Chardonnay	Trentino	2012	0,1
Frascati	Lazio	2015	
Gewürztraminer	Alto Adige	2015	
Gewürztraminer *	Alto Adige	2014	
Grillo	Sicilia	2016	
Pinot Bianco *	Alto Adige	2015	
Prosecco	Veneto	2015	
Sauvignon	Alto Adige	2015	
Bianco generico	Veneto	2015	0,5
Bianco generico	Alto Adige	2016	
Bianco generico *	Trentino	2009	
Chardonnay	Trentino	2008	
Chardonnay	Italia	2015	
Pinot Grigio	Trentino	2015	
Pinot Grigio	Sicilia	2015	
Pinot Grigio *	Trentino	2015	
Bianco generico	Trentino	2015	2,0
Chardonnay	Alto Adige	2015	
Chardonnay	Alto Adige	2014	
Gewürztraminer	Alto Adige	2015	
Müller Thurgau	Trentino	2015	
Pinot Grigio	Trentino	2015	
Pinot Grigio *	Alto Adige	2014	
Prosecco *	Veneto	2015	
Chardonnay	Trentino	2016	5
Gewürztraminer *	Trentino	2016	
Moscato Giallo	Trentino	2016	
Müller Thurgau	Trentino	2016	
Müller Thurgau	Trentino	2016	
Pinot Grigio	Trentino	2016	
Pinot Grigio *	Veneto	2016	
Sauvignon	Trentino	2016	
Chardonnay	Trentino	2015	10
Chardonnay	Italia	2016	
Gewürztraminer	Alto Adige	2015	
Grillo	Sicilia	2016	
Pinot Grigio	Veneto	2015	
Pinot Grigio	Trentino	2015	
Pinot Grigio *	Trentino	2015	
Sauvignon *	Alto Adige	2015	

* Campioni preparati e analizzati in doppio.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Confronto tra metodo HPLC-FLD e test ELISA

- La tecnica

La procedura analitica cromatografica di riferimento in HPLC-FLD permette la quantificazione del lisozima (in mg/L di proteina) presente in vino bianco e rosso. La separazione su colonna a fase inversa è basata su interazioni steriche, polari, o interazioni di adsorbimento tra la fase stazionaria e l'analita, senza prendere in considerazione l'effettiva attività enzimatica della proteina (Riponi *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda l'approccio immunoenzimatico, invece, la metodica ELISA utilizza anticorpi specifici diretti, determinandone la presenza a partire da un limite minimo di rilevabilità di circa 2 µg/L. Il test può essere realizzato non solo per mezzo di un analizzatore automatico, ma anche manualmente, utilizzando per la lettura colorimetrica un comune fotometro. Più nel dettaglio, il meccanismo di azione è sintetizzato in Figura 1. La procedura di analisi prevede la dispensazione di ciascuno standard e dei campione nei pozzetti (100 µL). Una prima incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente permette al lisozima (proteina target) presente di legarsi all'anticorpo specifico, situato sulla superficie interna dei pozzetti della micro piastra. Successivamente i pozzetti vengono svuotati e lavati con l'apposita soluzione di lavaggio per almeno tre volte, in modo da eliminare il materiale non specifico che non si è legato alla parete dei pozzetti. Si aggiunge, poi, l'enzima coniugato (100 µL) che, durante i successivi 20 minuti di incubazione, si lega al lisozima, a sua volta già legato all'anticorpo specifico contenuto nei pozzetti. Dopo aver ripetuto la procedura di lavaggio dei pozzetti, si aggiunge il substrato enzimatico (100 µL), che durante l'incubazione permetterà lo sviluppo di una colorazione blu, la cui intensità è proporzionale alla quantità di lisozima presente nei campioni e negli standard. Infine, l'aggiunta di una soluzione bloccante (100 µL) causerà il viraggio di colore dal blu al giallo, letto mediante fotometro, utilizzando un filtro a 450 nm e un filtro di riferimento a 620 nm.

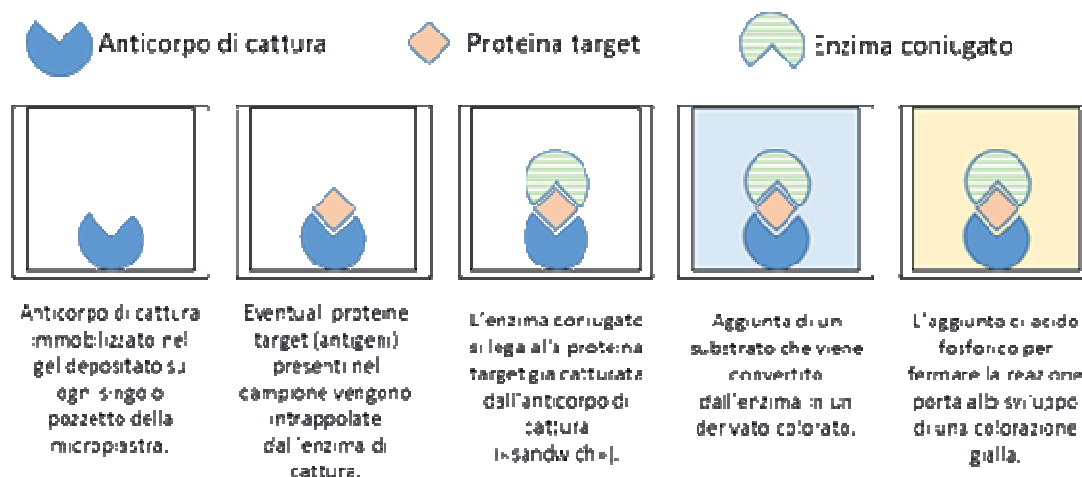


Figura 1. Schema della procedura di analisi con test ELISA

- ***Caratteristiche prestazionali***

Per l'approccio cromatografico, la quantificazione è stata ottenuta dal confronto con una retta di taratura (modello lineare) ottenuta iniettando a 5 diverse concentrazioni (0,1 - 0,5 - 2,0 - 5,0 - 10 mg/L), ciascuna in doppio, una soluzione di lisozima in similvino. Il coefficiente di determinazione (R^2) è risultato maggiore di 0,99. Il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione sono stati calcolati come 3 e 10 volte, rispettivamente, la deviazione standard ottenuta da 3 iniezioni dello standard a concentrazione corrispondente al punto più basso della retta di taratura. Tali limiti sono 0,03 e 0,09 mg/L, rispettivamente, inferiori, quindi, ai valori (0,18 e 0,59 mg/L) riportati nel metodo OIV (OIV-MA-AS315-14). La ripetibilità dell'analisi è stata valutata iniettando 6 volte uno stesso campione di vino bianco addizionato di 0,1 mg/L di lisozima, ottenendo un coefficiente di variazione percentuale inferiore al 4 %.

Per l'analisi immunoenzimatica, come dichiarato nella scheda tecnica del kit commerciale utilizzato, la determinazione è quantitativa nell'intervallo 2 – 250 µg/L e soddisfa ampiamente i recenti limiti OIV (OIV-COMEX 502-2012), ovvero un limite di rilevazione inferiore a 0,25 mg/L e un limite di quantificazione inferiore a 0,5 mg/L. La curva di taratura è stata ottenuta dall'analisi delle 5 soluzioni standard a concentrazione crescente di lisozima fornite nel kit.

La ripetibilità dell'analisi è stata valutata analizzando 6 volte uno stesso campione di vino bianco addizionato di 0,1 mg/L di lisozima: il coefficiente di variazione percentuale è risultato inferiore al 3 %.

- ***Tempo di analisi***

Dal punto di vista della preparazione del campione, non ci sono grandi differenze tra i due metodi presi in esame: l'approccio HPLC-FLD richiede che i campioni di vino vengano portati a pH 2 e filtrati, mentre nel test ELISA è necessaria una diluizione con il tampone di estrazione. Considerando il tempo necessario affinché la procedura analitica venga portata a termine fino all'ottenimento dei risultati, il metodo HPLC-FLD richiede all'incirca 55 minuti per ogni singolo campione e la presenza di personale specializzato per il controllo di ogni cromatogramma (verifica dell'assenza di lisozima o, in caso contrario, integrazione e quantificazione del picco di interesse). In caso di utilizzo del test ELISA, invece, l'esecuzione dell'intera procedura analitica richiede circa 90 min (tre incubazioni da 20 min ciascuna, cui si somma il tempo per dispensare standard, campioni e reagenti, per lavare i pozzetti e per la lettura fotometrica), ma con il vantaggio che le tempistiche richieste non variano sensibilmente per serie analitiche fino a 20 campioni circa, con, inoltre, il grande vantaggio di poter eseguire contemporaneamente e in tempi analoghi anche la determinazione di caseina e ovoalbumina, utilizzando, i rispettivi kit ELISA commerciali.

- **Recuperi medi percentuali**

Per confrontare le prestazioni dei due approcci (HPLC-FLD e test ELISA) sono stati riportati in grafico i recuperi medi percentuali e le relative deviazioni standard (Figura 2) per ogni gruppo di 8 vini bianchi aggiunti di concentrazioni crescenti di lisozima.

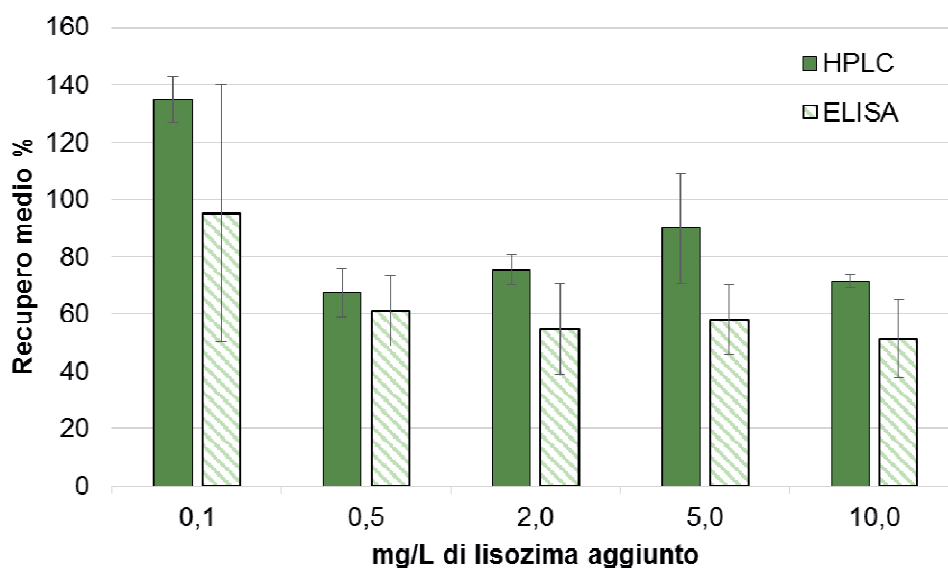


Figura 2. Recuperi medi percentuali e deviazioni standard ottenuti utilizzando i due metodi testati.

Tutti i campioni di vino precedentemente aggiunti di lisozima e analizzati con il metodo HPLC-FLD ottimizzato presentano un recupero percentuale medio (N=8) del 135 % per aggiunte di 0,1 mg/L e del 67, 75, 90 e 71 % per le aggiunte di 0,5 – 2,0 – 5,0 - 10 mg/L, rispettivamente.

Considerando, invece, i campioni sottoposti a test ELISA, il recupero percentuale medio (N=8) è del 94 % per aggiunte di 0,1 mg/L e scende al di sotto del 50 % per aggiunte maggiori: 51, 46, 48 e 42 % per le aggiunte di 0,5 - 2,0 - 5,0 - 10 mg/L, rispettivamente. Poiché tutti i campioni hanno sviluppato colorazione gialla e sono stati, quindi, quantificati, si è esclusa la presenza di falsi negativi. L'assenza di falsi positivi è stata confermata analizzando 15 campioni di vino (bianco, rosso e rosé) verificati privi (< 0,1 g/L) di residui di lisozima.

I recuperi medi percentuali sono, quindi, maggiori e le deviazioni standard sono minori per i dati ottenuti con l'analisi HPLC-FLD. Questo sottolinea le migliori performance del metodo HPLC-FLD (metodo ufficiale OIV) per la quantificazione del lisozima (indipendentemente dalla sua attività) in vino per valori maggiori del limite di rilevabilità.

Per bassi livelli di lisozima (intorno a 0,1 mg/L) la risposta dei due metodi è, invece, del tutto confrontabile, sebbene il test ELISA abbia mostrato una maggiore dispersione dei dati. Inoltre, riportando in grafico i valori, espressi in mg/L, di lisozima dei campioni aggiunti e analizzati con il test ELISA rispetto a quelli ottenuti con il metodo ufficiale HPLC-FLD si può notare una certa correlazione ($R^2 = 0,86$) tra i due metodi presi in considerazione (Figura 3). A livelli di lisozima maggiori di 1 mg/L, tuttavia, la risposta tra i due metodi è molto diversa, come dimostra la pendenza della retta (0,57), molto lontana dal valore teorico di 1, corrispondente a una completa corrispondenza in termini prestazionali tra i due metodi.

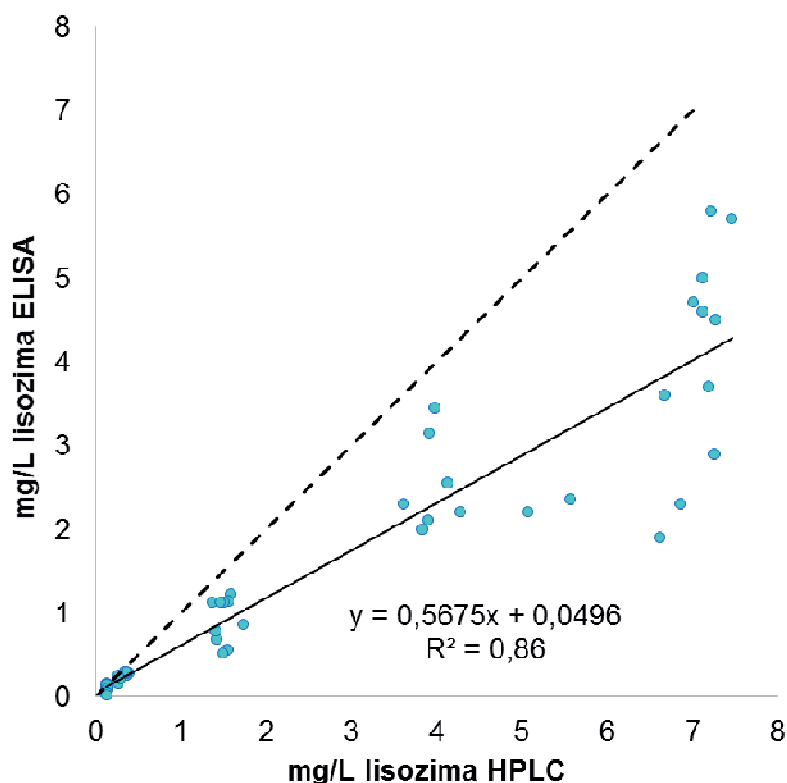


Figura 3. Confronto tra i valori ottenuti con il metodo di riferimento (HPLC) e quelli ottenuti con il test ELISA. Sono mostrate la linea di tendenza teorica (valori HPLC = valori ELISA; linea tratteggiata) e quella riferita ai valori sperimentali (linea continua).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dal confronto tra l'approccio cromatografico e immunoenzimatico per la determinazione del lisozima in campioni di vino bianco aggiunti è emerso che, per livelli di contaminazione superiori al limite di rilevabilità, la quantificazione con metodo HPLC-FLD, come proposto dall'OIV, rimane sicuramente più affidabile.

Tuttavia, l'assenza di falsi positivi e falsi negativi e i recuperi medi maggiori del 94 % rendono il test ELISA un ottimo approccio per la determinazione della presenza/assenza di lisozima in

campioni di vino. Inoltre, il test ELISA, con o senza analizzatore automatico, ha sicuramente il vantaggio di permettere l'analisi di un elevato numero di campioni in tempi rapidi, senza l'utilizzo di solventi pericolosi e senza la necessità di personale qualificato né di strumenti analitici complessi e costosi. L'utilizzo di tale approccio garantirebbe, inoltre, una certa uniformità a livello di metodica proposta dall'OIV per la determinazione di allergeni proteici derivati da latte e uovo.

Considerati i vantaggi dell'approccio immunoenzimatico rispetto a quello cromatografico, sia in termini economici che pratici, la diffusione di test ELISA anche per la determinazione del lisozima in vino permetterebbe una maggior fruibilità dell'analisi nei controlli routinari e un contenimento dei costi, facilitando la posizione dei produttori di vino che devono tutelare la sicurezza di soggetti allergici e, contemporaneamente, valorizzare il proprio prodotto.

Bibliografia

- Bartowsky E.J., Costello P.J., Villa A., Henschke P.A. (2004). Chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 143-150.
- Liburdi K., Benucci I., Esti M. (2014). Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 1062-1073
- REGOLAMENTO (CE) N. 2066/2001 DELLA COMMISSIONE del 22 ottobre 2001 che modifica il regolamento (CE) n. 1622/2000 per quanto concerne l'utilizzazione del lisozima nei prodotti vitivinicoli. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*. L 278/9, 23.10.2001.
- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 579/2012 DELLA COMMISSIONE del 29 giugno 2012 che modifica il regolamento (CE) n. 607/2009 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 479/2008 del Consiglio per quanto riguarda le denominazioni di origine protette e le indicazioni geografiche protette, le menzioni tradizionali, l'etichettatura e la presentazione di determinati prodotti vitivinicoli. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*. L 171/4, 30.06.2012.
- OIV-COMEX 502-2012. Revision of the limit of detection and limit of quantification related to potentially allergenic residues of fining agent proteins in wine.
- Lacorn M., Gößwein C., Immer U. (2011). Determination of residual egg white proteins in red wines during and after fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 382–385.
- Riponi C., Natali N., Chinnici F. (2007). Quantification of hen's egg white lysozyme in wine by an improved HPLC-FLD analytical method. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58:3, 405-409.

