# Alergeni u vinu

**Miloš, Mara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:779650

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Mara Miloš**

**6246/PT**

# Alergeni u vinu

## ZAVRŠNI RAD

**Modul: Kemija i tehnologija vina**

**Mentor: Prof.dr.sc. Mara Banović**

**Zagreb, 2016**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA**

**KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina**

# ALERGENI U VINU

Mara Miloš 6246/PT

**Sažetak**: Cilj ovog rada je dati pregled eksperimentalnih i kliničkih podataka o poznatim i potencijalno alergenim tvarima u vinarstvu, kao i trenutne zakonske regulative za takve tvari. Tijekom vinifikacije, grožđe, mošt i vino su osjetljivi na promjene i defekte koji bitno utječu na prihvatljivost kod potrošača s alergijama. Alergeni aditivi, kao sulfiti i lizozim iz jaja se primjenjuju radi kontrole procesa fermentacije i kvarenja vina. Biogeni amini nastali u visokim koncentracijama mogu direktno ili indirektno utjecati na toksičnost i alergijski potencijal vina. Proteinski proizvodi se koriste kao sredstva za bistrenje, za uklanjanje neželjenih netopljivih čestica i koloidnnih tvari mošta ili vina, radi poboljšanjea njihove stabilnosti i senzorskih svojstava. Neki od njih (bjelanjak, kazein, riblja želatina) imaju alergijski potencijal i prisutnost njihovih ostataka u konačnom proizvodu može predstavljati rizik za alergične osobe.

**Ključne riječi: alergeni, alergije na vino i grožđe, biogeni amini, sulfiti, sredstva za bistrenje**

**Rad sadrži: 27 stranica, 3 slike, 6 tablica, 48 literaturnih navoda, 00 priloga**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb**

**Mentor: Prof. dr. sc. Mara Banović**

**Rad predan: rujan, 2016.**

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Undergraduate studies Food Technology**
**Department of food engineering**
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

# ALLERGENS IN WINE

Mara Miloš 6246/PT

**Abstract:** The aim of this work was to review the experimental and clinical data about known and potentially allergenic substances in wine, as well as the current legislation for such substances. During vinification, grapes, grape must and wine are sensitive to changes and defects that materially affect the acceptability among consumers with allergies. Allergens additives, like sulfites and lysozyme, are included among the wine supplements in terms of control of the fermentation process and the perishability of wine. Biogenic amines in high concentrations can directly or indirectly influence the toxicity and allergic potential of wine. Proteinous products are widely used as fining agents in wine to remove unwanted insoluble particles and colloidal materials from the must or wine, and to improve stability organoleptic properties. Some of them (egg, casein, fish gelatin) have allergic potential and the presence of their residues in the final product may pose a risk for allergic people.

**Keywords: allergens, wine and grape allergies, biogenic amines, sulphites, fining agents**

**Thesis contains: 27 pages, 3 figures, 6 tables, 48 references, 00 supplements**
**Original in: Croatian**
**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb**
**Mentor: Full professor Dr.sc. Mara Banović**
**Thesis delivered: September, 2016**

## SADRŽAJ


**1 UVOD 1**

**2 TEORIJSKI DIO 2**

**2.1 Alergija 2**

2.1.1 Alergeni 3

2.1.2 Simptomi alergija 4

**2.2 Zakonodavstvo 5**

**2.3 Alergeni iz grožđa 8**

**2.4 Alergeni u vinu 10**

2.4.1 Alergeni kao posljedica djelovanja mikoorganizama 11

2.4.1.1 Biogeni amini 11

2.4.2 Alergeni iz aditiva ili sredstava za bistrenje 14

2.4.2.1 Sulfiti 14

2.4.2.2 Sredstva za bistrenje 15

**ZAKLJUČAK 22**

**3 LITERATURA 23**

# 1 UVOD

“Ljudi imaju pravo očekivati za hranu koju jedu da bude sigurna i prikladna za potrošnju. Bolesti uzrokovane hranom i koje se prenose hranom su u najboljem slučaju neugodne; u najgorem slučaju, one mogu biti kobne” (*Codex Alimentarius*, 1997). Osnovna uloga imunološkog sustava ljudskog organizma je da obrani tijelo od svega što je strano i potencijalno štetno, bilo porijeklom iz unutrašnje ili vanjske sredine. Na taj način se kod zdravih osoba stvara imunitet tj. otpornost prema štetnim čimbenicima. Posljednjih dvadeset godina učestalost alergija se udvostručila, a time i povećala svijest o toj opasnosti. Alergija predstavlja promijenjeno, preosjetljivo stanje imunološkog sistema pojedinih osoba na tvari iz okoliša na koje većina ne reagira, jer u biti ne predstavljaju prijetnju zdravlju. U modernom društvu, vino se smatra jedim od glavnih krivaca za alergijske reakcije nakon obroka. Iako su reakcije posredovane alergen specifičnim imunoglobulinom E (IgE) na proteine grožđa opisane u literaturi, one su stvarnosti vrlo rijetke. Konzervansi, posebno sumporni dioksid, se obično smatraju odgovornima za moguće alergijske nuspojave. Već dugi niz godina u mnogim zemljama, vinske etikete su obavezne definirati dodatak konzervansa (kao što je sumporni dioksid i sorbinska kiselina), antioksidansa (kao što su askorbinska i eritorbinska kiselina), te materijala za bojenje (poput karamele). U Hrvatskoj to još uvijek nije obavezno, ali prilagođavanje etiketa svjetskom tržištu će to zasigurno zahtijevati. Zahtjev za označavanje sumpornog dioksida se odnosi na njegov potencijal da uzrokuje reakciju na sulfite kod osjetljivih astmatičnih osoba. Može se pretpostaviti da dodatak proteina tijekom procesa proizvodnje vina može povećati rizik od nuspojava kod pojedinaca osjetljivih na potencijalno alergene proteine iz hrane. Poznati alergeni proteini se tradicionalno koriste u procesu proizvodnje vina. Mlijeko, upareno mlijeko, kazein, kalij kazeinat i riblji mjehur se koriste u procesu bistrenja za uklanjanje fenolnih spojeva i tanina iz bijelog vina, a bjelanjak za uklanjanje taninskih spojeva iz crnog vina.

U ovom radu će biti predstavljeni spojevi koji su poznati kao alergeni u vinu, kao i spojevi u čiju se alergenost još uvijek sumnja, na osnovu dostupnih literaturnih podataka i zakonske regulative koje se na njih odnose.

# 2 TEORIJSKI DIO

## 2.1 Alergija

Alergijske reakcije mogu se javiti bilo kad tijekom života, a najčešće su u prvim godinama. U razvijenim zemljama Zapada navodi se učestalost tih reakcija kod djece od 8 – 28%. Kod odraslih su znatno rijeđe: 1,4 – 1,8% (Bulat-Kardum, 2013). Rizik od alergijske reakcije je teško identificirati zbog brojnih čimbenika, kao što su individualna osjetljivost, dob, spol, genetska konstitucija, prehrambene navike, i još dosta uglavnom nepoznatih, čimbenika iz okoliša. Alergija na hranu je odgovor imunološkog sustava na hranu za koju tijelo pogrešno vjeruje da je štetna. Postojeće brojke pokazuju da je vjerojatnost odrasle populacije koja pati od alergija na hranu <2%. Alergije mogu predstavljati opasnost za zdravlje, a teške alergijske reakcije mogu čak dovesti do smrti (Sampson, 2004). Sklonost ka alergiji je nasljedna i oko 30% populacije je sklono ovim poremećajima, a kod oko 20% se ona i manifestira. Broj oboljelih je u stalnom porastu u svijetu i kod nas.

Pri konzumiranju hrane, tijelo može reagirati alergijskom reakcijom, ali i netolerancijom ili nepodnošljivošću na neku hranu i/ili njen sastojak.

Za razliku od alergije, netolerancija se teže prepoznaje. Netolerancija je uzrokovana genetskim ili stečenim nedostacima u enzimatskom i imunološkom sustavu obaveznom za probavljanje hrane; npr. nedostatak enzima potrebnih za razgradnju laktoze (Popović, 2009).

Alergije na hranu, kao i drugi oblici nepodnošenja hrane, spadaju među najsloženije probleme u alergologiji, zbog čega njihovo rješavanje zahtjeva puno vremena, a najvažniji podatak u anamnezi je u kojem se razdoblju od uzimanja određene hrane pojavljuju prvi simptomi alergije. Alergološka dijagnostika alergije na hranu je uspješna i uzrok reakcija (tj. hrana koja izaziva alergijsku reakciju) se dijagnosticira brzo u većini slučajeva. Kod intolerancija, alergološka dijagnostika je neuspješna, a uzroci intoleracija su različiti (aditivi, biogeni amini u hrani, među njima i histamin, manjak enzima u organizmu i drugo), pa se primjenjuju druge, često zahtjevne, dijagnostičke metode. U liječenju alergija na hranu najčešće se primjenjuje eliminacijska dijetoterapija tj. izbacivanje određene hrane iz prehrane ili se primjenjuje određena preporučena dijeta. Međutim, promjene u načinu pripreme hrane u domaćinstvu i industriji, te nepotpuno poznavanje sastava hrane samo su neki od čimbenika koji otežavaju učinkovito izbacivanje određene hrane ili njenih sastojaka iz prehrane. Prema novijim podacima primijećen je porast broja slučajeva alergija na hranu koja se nije smatrala

značajnijim alergenom, što dokazuje da bilo koja hrana može uzrokovati alergijske reakcije jer one ovise o poteškoćama obrambenog sustava organizma, a ne o sastavu hrane koju najveći broj ljudi konzumira bez poteškoća. Primjeri takve hrane su: svinjetina, govedina, riječna riba, riža (koja je inače zamjenska hrana za alergičare), određeno povrće (špinat, blitva, zelje, mrkva, peršin) i voće (marelica, breskva, lubenica, grožđe, šljive, kruške, jabuke), kakao i kava (Colić-Barić, 2009).

Liječnici kod pacijenata smatraju da je najvažnije utvrditi razliku između netolerancije na neku hranu i alergije na neku hranu. Točno utvrđivanje da li je neko alergičan na hranu ili nije, nije jednostavno, a zavisi od količine alergena koji je unesen u tijelo i od ukupnih učinaka pri učestalom unošenju hrane koja ih sadrži. Osoba kod koje se dijagnosticira alergija na hranu često je alergična i na neka sredstva često prisutna u okolini i/ili upotrebi (pelud, dlaka, vuna, dekorativni puderi, prašina itd.) pa je teško točno utvrditi njen pravi uzrok (Popović i sur, 2009).

### 2.1.1 Alergeni

Alergeni su tvari koje izazivaju alergijsku reakciju i teško ih je pri uobičajenom načinu života izbjeći. Oni su svuda oko nas, u hrani, ljekovima, sredstvima za pranje, odjeći, nakitu, prirodi i okolini u kojoj živimo. U hrani je najčešće riječ o proteinima kao izazivačima alergijskih reakcija (Colić- Barić, 2009).




Slika 1. “Big 8”- osam najpoznatijih i najčešćih alergena u svijetu (http://www.betternutrition.com/facts-food-allergies/)

Nakon unosa u organizam, alergeni se apsorbiraju i ulaze u krv gdje se sukobljavaju s obrambenim imunosistemom. Ako je to prvo izlaganje organizma alergenu, klinički znakovi najčešće nisu izraženi. Dakle, tijelo zdravog čovjeka proizvodi specifična antitijela koja se aktiviraju kada drugi put alergeni dospiju u čovjekov organizam. Prema medicinskoj definiciji, alergija je reakcija organizma na neki od sastojaka hrane (najčešće protein), smatrajući ga stranom tvari (antigenom) s posljedičnom promjenom imunološkog odgovora organizma.

To je tip I. alergijske reakcije gdje B-limfociti prepoznaju antigene i pokreću specifični mehanizam obrane, stvarajući antitijela imunoglobuline E. Imunoglobulini su kompleksne proteinske molekule u obliku slova Y koje predstavljaju specifično ubojito oružje imunog sustava protiv bilo kojeg stranog tijela. Oni bivaju otpušteni te putuju krvnom plazmom sve dok ne naiđu na antigen kojeg prepoznaju i unište. Istovremeno se oslobađa i medijator alergijske reakcije, od kojih je najvažniji histamin. Postoje dva receptora za histamin, H1 (respiratorni, koža) i H2 (probavni sustav). Alergijske reakcije na hranu posredovane IgE protutijelima vrlo su raznolike i mogu uzrokovati sustavne reakcije opasne po život (anafilaktički šok) ili zahvatiti jedan ili više organskih sustava: a) kožne reakcije (urtikarija, angioedem, atopijski dermatitis); b) oralni alergijski sindrom tj.osjećaje pečenja ili svrbeža jezika, otok jezika, usnica, nepca ili ždrijela; c) dišni sustav - simptomima astme i alergijskog rinitisa; e) probavni sustav (grčevi, mučnina, povraćanje i proljev) (Katalenić, 2007).

Alergija na hranu koja nije posredovana IgE protutijelima, koje se još nazivaju nepodnošljivost ili netolerancija hrane (laktoza, gluten, histamin) može se očitovati posebnim kliničkim stanjima. Dijagnoza tih stanja zahtijeva pažljivu bolničku obradu (alergijski eozinofilni gastroenteritis, enterokolitički sindrom, hranom inducirana enteropatija, plućna hemosideroza, herpetiformni dermatitis, itd.). Reakcije se javljaju najčešće vrlo brzo (unutar 1 sata), a rijetko nakon nekoliko sati (Lasić, 2016.).

### 2.1.2 Simptomi alergija

Kada organizam preosjetljive osobe dođe u kontakt sa alergenom u roku od nekoliko minuta, sati ili dana pokazati će se simptomi alergije. Alergije mogu uzrokovati sistemske reakcije opasne po život (anafilaktički šok) ili zahvatiti jedan ili više organskih sistema. Najčešće su kožne reakcije (urtikarija, angioedem, atopijski dermatitis). Nerijetko se alergija na hranu

manifestira samo tzv. oralnim alergijskim sindromom, odnosno osjećajem trnaca u jeziku, otokom jezika, usnica, nepca ili ždrijela. Zahvaćenost respiratornog sustava može se manifestirati simptomima astme i alergijskog rinitisa. Simptomi alergije na hranu u probavnom sustavu su grčevi, mučnina, povraćanje i proljev. Slabo izražena klinička slika predstavlja: lagano crvenilo kože, peckanje u očima, glavobolju dok se ozbiljnijim smatraju abdominalni grčevi, proljev, povraćanje i gubitak apetita. Drugi simptomi obuhvaćaju kašljanje, astmu, bronhitis, crvenilo, urtikariju, dermatitis i različite probleme digestivnog trakta (Jackson, 2003).

Ako se s liječenjem ne počne na vrijeme ili ako se potpuno ne izbaci hrana koja izaziva alergiju, stanje se kod velikog broja oboljelih pogoršava. Najčešći ljekovi su antihistaminici i, kratkotrajno, kortikosteroidi. Osobe koje su jednom doživjele anafilaktički šok trebale bi uvijek imajti ljek za hitna stanja (autoinjektor adrenalina i antihistaminik s brzim djelovanjem). Oboljeli, kao i članovi njihovih obitelji, moraju znati kako da daju lijek. Iako lječenje anafilaktičkog šoka nije bez rizika, najčešće je to jedini način spašavanja života. Kada se ustanovi na što je osoba alergična, izbjegavanje nije uvijek jednostavno: trebalo bi naučiti čitati etikete i znati sastav hrane. Tako, dolazimo i do problema da se na deklaracijama ne navod euvijek sve tvari koje mogu biti u proizvodu. Kod vina za primjer možemo uzeti Sredstva za bistrenje vina koja mogu potjecati od mlijeka, jaja ili ribe (Webber Witt, 2014).

## 2.2 Zakonodavstvo

Za hrvatske proizvođače označavanje alergena je definirano Zakonom o hrani (Narodne Novine. 117/2003), Pravilnikom o općem deklariranju ili označavanju hrane,(Narodne Novine 114/2004) i Pravilnikom o izmjenama i dopunama pravilnika o općem deklariranju ili označavanju hrane (Narodne Novine 34/2005 ). U posljednjih 20 godina statistike pokazuju povećan broj osoba koje pate od alergijskih reakcija i netolerancija na sastojake hrane. Iz tog razloga u studenom 2003. godine, Direktiva 2003/89 / EC Europskog parlamenta stupa na snagu 'Sastojkom' se označava svaka tvar, uključujući aditive, koji se koriste u proizvodnji ili pripremi hrane i još uvijek su prisutni u gotovom proizvodu, čak i ako se nalaze u izmijenjenom obliku. Europska komisija je proglasila Direktivu 2003/89 / EC - kao "Direktivu za označavanje alergena", sa 14 najčešćih potencijalnih alergena kao što je

prikazano na slici 2. Ove alergene treba naglasiti jasno na deklaraciji hrane ako su sadržane direktno u hrani kao sastojak ili su korišteni kao spoj ili sastojak koji se rabio u proizvodnji hrane. Neki od tih navedenih sastojaka se koriste u proizvodnji vina (Direktiva EC/ 2003/89).

Tablica 1. 14 najčešćih potencijalnih alergena koji se moraju naznačiti na deklaraciji (Direktiva EC/ 2003/89)

**Sastojci iz članka 6. Stavka 3a, stavka 10. I stavka 11.**

| |
|---|
| Žitarice koje sadrže gluten (npr. Pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili sojevi dobiveni njihovim križanjem i njihovi proizvodi. |
| Rakovi i proizvodi od rakova. |
| Jaja i proizvodi od jaja. |
| Riba i prozvodi od riba. |
| Kikiriki i proizvodi od kikirikija. |
| Soja i proizvodi od soje. |
| Mlijeko i mliječni proizvodi uključujući laktozu. |
| Orašasti plodovi, tj. badem (*Amygdalus communis L.*), lješnjak (*Corylus avellana),* orah (*Juglans regia*), indijski orah (*Anacardium occidentale*), američki orah (*Carya illinoiesis (Wangenh.) K. Koch*), brazilski orah (*Bertholletia excelsa*), pistacija (*Pistacia vera*), orah makadamija i orah Queensland (*Macadamia ternifolia*) i proizvodi od njih |
| Celer i proizvodi od celera |
| Gorušica i proizvodi od gorušice |
| Sjemenke sezama i proizvodi od njih |
| Sumporni dioksid i sulfiti u koncentracijama većim od 10 mg/kg ili 10 mg/l izraženi kao $SO_2$. |

Jasno označavanje na deklaraciji daje potrošaču sve podatke o hrani, a time i mogućnost odluke i odabira prema svojim potrebama. 2005. godine u Europi je izašla Direktiva 2005/26/EC sa popisom derivata alergena koji se ne moraju posebno označiti jer ne uzrokuju alergije, a prikazani su u tablici 2. Među njima su navedeni i derivati koji se dobivaju od mlijeka, jaja ili ribe a koriste se u procesu bistrenja vina. Direktivom 2007/68/EC se dopušta samo izostavljenje ribljih proteina sa deklaracije, dok se za ostale potencijalne alergene kao jaja i mlijeko, još uvijek vrše istraživanja. Uzimajući u obzir da promjena u pravilima označavanja uvelike utječe na industrije, Direktive 2005/26 / EZ i 2007/68 / EC dopuštaju stavljanje na tržište hrane sve do 31. svibnja, 2009. Ovaj datum je kasnije produžen do 31. prosinca 2010. To razdoblje prilagodbe novim direktivama pomaže uglavnom mala i srednja poduzeća. Štoviše, izmjenama i dopunama Uredbom 2010/1266 / EZ dopušta znanstvenicima dodatno istražiti rizike tih sastojaka. Konačno, u skladu s Direktivom EU br. 579/2012 , 29. lipnja 2012 (Izmjenama i dopunama Uredbe Komisije 607/2009), utvrđeno je da vina koja sadrže potencijalno alergene dodatke ili pomoćne tvari trebaju biti podvrgnuta određenom označavanju "ako se njihova prisutnost može se otkriti u konačnom proizvodu".

Tablica 2. Popis derivata alergena koji se ne moraju posebno označiti jer ne uzrokuju alergije (Direktiva 2005/26/EC)

| DERIVATI OD | NE UZROKUJU ALERGIJE I POSEBNO SE NE OZNAČAVAJU |
|---|---|
| Žitarica koje sadrž gluten | -Pšenični glukozni sirup uključujući i dekstrozu i njene proizvode<br>-Pšenični maltodekstrin, ječmeni glukozni sirup<br>-Žitarice koje se koriste za dobivanje alkohola |
| Jaja | -Lizozim koji se korristi za bistrenje vina<br>-Albumin za bistrenje jabukovače, piva i vina |
| Ribe | -Riblja želatina kao nosač za vitamin i arome |

| | |
|---|---|
| | -Riblja želatina za bistrenje jabukovače, piva i vina |
| Soja | -Potpuno rafinirano sojino ulje i masti<br>-Prirodna smjesa tokoferola<br>-Izdvojeni fitosteroli i fitosterol esteri<br>-Biljni staniol esteri proizvedeni iz sterol ulja soje |
| Mlijeko | -Siirutka koja se koristi za pripravu alkoholnih destilata<br>-Laktitol<br>-Kazein za bistrenje jabukovače i vina |
| Orašasti plodovi – koštunjičavo voće | -Koji se koriste za proizvodnju destiliranih alkoholnih pica<br>-Koji se koriste (lješnjak, orah) za aromatiziranje alkoholnih pica |
| Celer | -Ulje lista i sjemena<br>-Oleorezin sjemena |
| Gorušica | -Ulje sjemena<br>-Oleorezin sjemena |

## 2.3 Alergeni iz grožđa

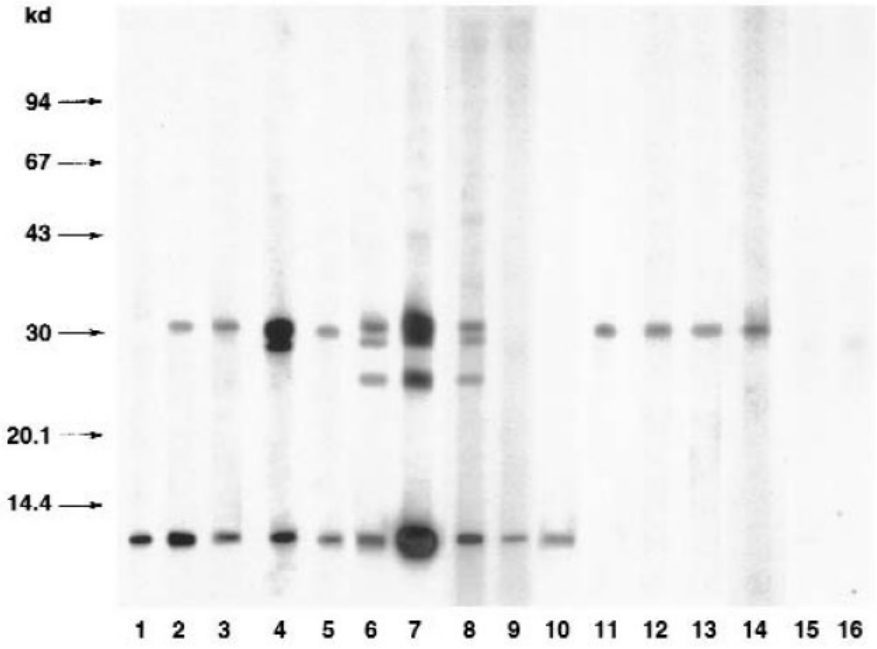
Većina proteina vina je podrijetlom od grožđa, dok su neki oslobođeni iz kvasca ili bakterija. Proteini grožđa koji se nalaze u vinu su uglavnom proteini vezani uz patogenezu. Formiraju se u biljkama kao otpor protiv gljivičnih patogena i proizvode se zbog njihovog potencijala kao bio-kontrolnih agenata. Nastaju akumulacijom u bobicama grožđa tijekom zrenja i izražava se kao rezultat biološkog ili abiotskog stresa Ovi proteini su vrlo otporni na proteolitičke napade i nizak pH vina, iz tih razloga ne nestaju tijekom vinifikacije i ostaju u vinu, te se spominju kao potencijalni alergeni grožđa i vina. Nedavna studija navodi da su gore navedeni proteini obloženi šećerima (glikoproteini), a bioinformatička studija pokazala

je da su strukture utvrđene u grožđanim glikoproteinima slične strukturama poznatih biljnih alergena, što bi moglo dovesti do potencijalne alergijske unakrsne reaktivnosti u vinu (Palmisano i sur., 2010).

U studiji Pastorello i sur. (2003) istaknuto je da grožđe i vino može izazvati alergijske reakcije kod osjetljivih bolesnika i da je glavni alergen iz grožđa endohitinaza 4, koja iz grožđa prelazi u vino.

Broj slučajeva alergijskih reakcija na grožđe je zanemariv, a i studije o odnosu između vina i alergijske reakcije su zabilježene kao rijetkost. Alergija na grožđe je često križna reaktivnost s drugim voćnim proteinima, za što je odgovoran lipid-transferni protein (LTP). Alergija na *Prunoideae* voćke (obitelj *Rosacea*); breskva, marelica, šljiva i trešnja, jedna je od najčešćih alergija na hranu u južnoj Europi. LTP je službeno priznati alergen u grožđu. Ovaj protein se može identificirati u nekim crnim vinima, a njegova prisutnost u bijelom vinu je rijetka. LTP je pravi pan alergen sa stupnjem unakrsne reaktivnosti. Zbog svoje izuzetne otpornosti na pepsin, LTP je potencijalno teški alergen hrane. (Wigand, 2011).

Prijenos alergenih proteina iz grožđa u vino je pokazana istrživanjem na 14 pacijenata čija medicinska povijest bilježi ozbiljne alergijske reakcije nakon konzumiranja grožđa i vina. IgE imunoblatin ekstrakta grožđa sa serumima uzetim od 14 bolesnika je predstavljen na slici 3. Neki pacijenti (br. 1-8, 10, 11, 13 i 14) su pokazali sustavne reakcije samo nakon jedenja grožđa. Pacijenti 3 i 14 su imali teške reakcije na jedenje grožđa i nakon čega su pili vino, a pacijent 12 je doživio anafilaktički šok nakon samo pijenja vina. Zadnje 2 trake su rezultati iz kontrolne skupine pacijenata koji nisu alergični na grožđe (bolesnik 15 je pacijent alergičan na breskve, a pacijent 16 je alergičan na pelud trava). Glavni alergen u ispitivanoj populaciji je 30-kd protein na koji je reagiralo 11 od 14 pacijenata. Promatranjem je utvrđeno da je jedini protein na koji je reagirao pacijent broj 12 koji je alergičan samo na vino, što dovodi do zaključka da je to jedan od glavnih alergena u grožđu koji se prenosi u vino (Pastorello, 2003).




Slika 2. IgE imunoblotting 14 pacijenata koji pokazuju alergije na grožđe i vino (Pastorello i sur., 2003).

## 2.4 Alergeni u vinu

U vinu postoje dva moguća izvora alergena: rezidualni ostaci koji dolaze iz sredstva za bistrenje ili od mogućeg onečišćenja ukoliko vino dođe u doticaj sa različitim tvarima iz okoliša. Bistrenje je jedan od najjeftinijih koraka u proizvodnji vina s presudnim utjecajem na kvalitetu vina. Među proteinima koji se koriste za bistrenje neki su dobiveni iz hrane uključene u popis glavnih alergena- mlijeko, jaja, životinjska želatina, riblja želatina / riblji mjehur, ali u novije vrijeme se koriste i proteini dobiveni iz biljaka, kao što su pšenica i bijela lupina (Penas i sur., 2015). Općenito rezidualni ostataci imaju različite vrste izvora i razlikuju se od onečišćenja koje je "bilo koja biološka ili kemijska tvar, strano tijelo, ili druga tvar koja nije namjerno dodana, a koja može ugroziti sigurnost hrane " (Codex Alimentarius, 1997).
Postoji nekoliko studija koje su izvijestile pojedinim slučajevima imunološki posredovane reakcije nakon konzumacije vina, ali svakako još uvijek nedostaje oginalnih radova koji istražuju tu tematiku. Nedavno je provedena studija, u kojoj je proučavana netolerancija na vino kod odrasle populacije u Mainzu u Njemačkoj. Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 948

ispitanika u dobi od 20 do 69 godina (27,7%), od toga 68 (7,2%) je prijavilo simptome koji odgovaraju alergiji nakon konzumacije vina. Vinska netolerancija češće je ustanovljena kod žena (8,9%) nego muškaraca (5,2%). Alergija nalik gripi je češće uočena nakon uživanja u crnom vinu. Crvenilo i svrbež kože, kao i začepljen nos su najčešće spominjane reakcije (Wigand i sur., 2012.).

U pilot studiji 2015. godine u 19 ispitanika koji su sami prijavili osjetljivost na vino i 10 ispitanika koji nisu prijavili simptome osjetljivoti je podvrgnuto ispitivanju za specifične alergijske reakcije. Kod 2 ispitanika iz testne i 1 ispitanika iz kontrolne skupine su primjećeni neki oblici reakcija. Ovo pilot istraživanje pokazuje da možda postoji osjetljivost na proteinski sastav grožđa ili vina u Njemačkoj (Jaeckels i sur., 2015).

### 2.4.1 Alergeni kao posljedica djelovanja mikoorganizama

#### *2.4.1.1 Biogeni amini*

Proizvodnja fermentiranih namirnica i pića rezultira poželjnim ishodima, kao što su produžena trajnost higijenska sigurnost i poboljšane senzorske  i nutritivne vrijednosti. Međutim, metabolička aktivnost mikroorganizama koji sudjeluju također može dovesti do stvaranja neželjenih spojeva, kao biogenih amina. Biogeni amini su nisko molekularne organske dušične baze koje sadrže biološku aktivnost i imaju alifatske ili cikličke strukture. Oni nastaju iz aminokiselina dekarboksilacijom preko supstrat-specifičnih dekarboksilacijskih enzima. Iako su biogeni amini potrebni za mnoge kritične funkcije - alergijske reakcije, neurotranzicije i propusnosti krvnih žila u čovjeka i životinja, konzumiranje hrane koja sadrži visoke količine tih amina može imati toksikološki učinak. (Wigand i sur., 2012).

Dva su razloga za određivanje biogenih amina u hrani i vinima: njihova potencijalna toksičnost i mogućnost uporabe kao markera za kvalitetu hrane i vina. Neke od glavnih primjena analize biogenih amina su: kontrola kvalitete sirovina, intermedijera i krajnjih proizvoda, praćenje fermentacije, kontrola procesa i razvoj istraživanja. Utvrđivanje biogenih amina u složenim tvarima kao što je vino je vrlo teško, jer oni su obično prisutni u jako niskim koncentracijama. Biogeni amini se obično određuju tehnikama razdvajanja poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), kapilarnom elektroforezom (CE) i

plinskom kromatografijom (GC). Ovi postupci uključuju uglavnom spektrofotometrijsku ili fluorometrijsku detekciju i / ili razdvajanje masenom spektrometrijom (MS) (Ertan Anlı i sur, 2008). Pregled biogenih amina, aminokiselina kao njihovih prekursora te Nomenklatura po IUPAC-u prikazani su u tablici 2 (Webber Witt, 2014).

Tablica 3. Biogeni amini u vinu (Webber Witt, 2014)

| **Biogeni amin** | **IUPAC ime** | **Aminokiselina** |
|---|---|---|
| Histamin | 2-(1H-imidazol-4-il)etanamin | Histidin |
| Tiramin | 4-(2-aminoetil) fenol | Tirozin |
| Putrescin | Butan-1,4-diamin | Ornitin/ arginine |
| Etanolamin | 2-aminoetanol | Serin |
| Fenetilamin | Feniletan-2-amin | Fenilalanin |
| Kadaverin | 1,5-diaminopentan | Lizin |

Vino može biti idealan supstrat za proizvodnju biogenih amina jer njegov proizvodni proces uključuje lako dostupne aminokiseline, moguću prisutnost dekarboksilaza-pozitivnih mikroorganizama i povoljne uvjete okoliša koji utječu na rast mikroorganizama i aktivnost enzima dekarboksilaze (Marques i sur., 2008).

Postoje tri moguća ishodišta biogenih amina u vinima: 1) prisutni u moštu; 2) formiraju ih kvasci tijekom alkoholnog vrenja; 3) i / ili nastaju u vinu djelovanjem bakterija koje provode malolaktičku fermentaciju. Uvjeti kao što su temperatura, promjene pH, dostupnost kisika ili natrij-klorida su važni čimbenici koji utječu na količinu biogenih amina u gotovom

proizvodu. U posljednjih nekoliko godina, znanstvenici su potvrdili da biogene amine u vinu uglavnom proizvode bakterije mliječnog vrenja (LAB). Neki amini su normalni sastojci grožđa s količinama koje variraju ovisno o sortama, vrsti i sastavu tla, gnojidbi klimatskim uvjetima tijekom rasta, stupnju sazrijevanja, metodom izrade vina, zaostaloj mikrobnoj populaciji, procesom bistrenja, kao i kvascima koji posreduju u fermentaciji. (Ertan Anlı i sur., 2008). Obično se toksična doza u alkoholnim pićima smatra između 8 i 20 mg / L za histamin i 25 i 40 mg / L za tiramin, ali čak i manje od 3 mg / L feniletilamina može izazvati štetne fiziološke posljedice (Moreno-Arribas i sur., 2009).

*Histamin*

Histamin (2-(1H-imidazol-4-il)etanamin) je biogeni amin koji nastaje dekarboksilacijom aminokiseline L-histidina. Histaminska intolerancija (engl. *Histamine Intolerance*, HIT) pripada skupini reakcija prosjetljivosti koje nisu posredovane IgE-om i smatra se farmakološkom intolerancijom na hranu. Značajno je da su kod intolerancije na hranu simptomi slični onima kod klasične alergije posredovane IgEom, iako su obično blaži i kraće traju. Simptomi se mogu manifestirati na brojnim organima kao što su gastrointestinalni sustav, pluća, koža, kardiovaskularni sustav i mozak, što ovisi o ekspresiji histaminskih receptora (Lugović-Mihić i sur., 2012.).

Glavni enzim za metabolizam unešenog histamina je diamin oksidaza (DAO). Oslabljena razgradnja histamina uzrokovanu sniženom DAO aktivnost može uzrokovati brojne simptome oponašajući alergijske reakcije. Osim DAO histamine se razgrađuje i prstenastom metilacijom histamin-N-metiltransferazom (HNMT). Glavni uzrok netolerancije na histamin je zapravo umanjena enzimska razgradnja histamina uzrokovana genetskim ili stečenim oštećenjima enzimskih funkcija DAO ili HNMT. Alkohol, naročito crveno vino, bogato je histaminom i dokazani je inhibitor DAO. Među mnoštvom tvari sadržanih u vinu, drugi biogeni amini kao što je tiramin i sulfiti doprinose simptomima sažetima kao "netolerancija na vino" ili "astma crnog vina" (Maintz i sur., 2007).

### 2.4.2 Alergeni iz aditiva ili sredstava za bistrenje

#### *2.4.2.1 Sulfiti*

U vinu prisutni spojevi pod zajedničkim imenom sulfiti, skupina su spojeva koji sadrže sumpor. Nema vina koja su u potpunosti bez sulfita, jer su oni prirodni nusproizvodi fermentacije. Sulfiti pomažu pri inhibiciji rasta štetnih mikroorganizama, djeluju kao antioksidansi oksidiraju te imaju i druge pozitivne učinke na očuvanje vina (Dietrich i sur., 2005). Komplementarni sulfiti se dodaju u vina kao konzervans. Kod osjetljivih pojedinaca, sulfiti mogu izazvati napade astme ili čak anafilaktički šok. Pri koncentraciji od samo 10 ppm, vino mora pravno nositi oznaku upozorenja; ona je obvezna u gotovo svim zemljama proizvođačima vina (Christmann, 2001; Christmann and Freund, 2004 i Rankine, 2004).
Primjer takvog upozorenja na ambalaži prikazan je na slici 3.




Slika 3. Označavanje sulfita na etiketi (http://www.thekitchn.com/the-truth-about-sulfites-in-wine-myths-of-red-wine-headaches-100878)

Sumporni dioksid, SO2, također dokazano utječe na akumulaciju biogenih amina u vinu. Općenito, visoke razine SO2 smanjuju formiranje tiramina, jer inhibiraju razvoj mikroorganizama s aminokiselinskom dekarboksilaznom aktivnošću. U stvari, u prisustvu više od 100 mg / L SO2, nakupljanje biogenih amina u vinu je znatno smanjeno. Crvena vina sa 40 mg / l SO2 sadržavaju više tiramina (8 mg / l) nego histamina (2 mg / l), ako koncentracija SO2 dosegne 85 mg / l taj omjer se mijenja pa mjerimo 4/1 mg tiramina i 7/1

mg histamina (Webbeer Witt, 2014).

Vino se predstvlja kao značajan okidač za astmu. Iako su sulfitni dodaci uključeni i istaknuti kao jedan od glavnih uzroka vinom inducirane astme, izravni dokazi za tu teoriju su ograničeni. Prema Australskim istraživanjima iz 2001. Za samo četiri od 23 pacijenata asmatičara sa prijavljenom osjetljivosti na vino se može dokazati da su osjetljivi na sulfitne aditive, unatoč činjenici da su sulfiti predloženi kao glavni uzrok vinom inducirane astme. Značajno je spomenuti da su četiri osobe za koje se pokazalo da su osjetljivi na sulfite u vinu u ovoj studiji reagirale samo na vino koje sadrži 300 ppm tog dodatka, što je maksimalna razina sulfita dopuštena u australskima vinima. Nije bilo reakcija na vina koja sadrže 20- 150 ppm sulfita, iako sve četiri osobe svojom medicinskom povijesti ukazuju da su iznimno osjetljive na sulfite u vinu (Vally i sur., 2001).

#### *2.4.2.2 Sredstva za bistrenje*

U svijetu mnogi su različiti odjeli za istraživanje proveli istrage kako bi provjerili da li se za bistrenje vina koriste potencijalno alergene bjelančevine kazeina, mlijeka, jaja ili ribljih mjehura, te mogu li izazvati značajne kliničke alergijske reakcije (anafilaksija) u bolesnika s potvrđenim IgE-posredovanim relevantnim alergijama na hranu. Postoje mnoga sredstva za bistrenje organskog podrijetla koji se koriste u vinu. Neki od njih se više ne koriste, dok se drugi primjenjuju se samo u nekim zemljama. U ovom radu će biti riječi o onima koji se učestalo koriste u mnogim zemljama, a potencijalni su alergeni.

***Jaja***

Jaja su poznata kao najstariji agensi za bistrenje u vinarstvu, a koriste se kod crvenih vina kako bi izbistrili vino i uklonili nepoželjne tvari kao što su proteini, fenoli i oštri tanini koji uzrokuju okus gorčine u vinu. Preporučuje se za poliranje i omekšavanje okusa jakih crvenih vina.

*Bjelanjci*

Postoji mnogo različitih oblika sredstava od jaja koja se mogu koristiti za bistrenje vina. Dva glavna načina su korištenje svježih bjelanjaka ili osušenog praha bjelanjaka.

Korištenjem svježih li smrznutih bjelanjaka količina varira od jednog do tri jajašca po hektolitru. Osušeni prah bjelanjka, također se zove ovalbumin ili (suhi) ovoalbumin, jer se sastoji uglavnom samo od tog proteina. Količina koja se često koristi je od 4-16 g po hektolitru. Albumin iz bjelanjka je pozitivno nabijen te će vezati i apsorbirati negativno nabijene tvari kao što su tanini i s njima formirti pahuljasti talog u vinu. U koloidnom sustavu pahulje ne flokuiraju mnogo, ali se talože u čvrsti talog. Eliminacija taloga se obavlja pretakanjem, dekantiranjem, ali i centrifugiranjem ili filtracijom prije punjenja u boce (Ribéreau-Gayon i sur. 2006).

Tablica 4. Glavni alergeni u bjelanjku (albuminu) (Penas i sur., 2015)

| Protein | Internacionalni alergijski kod | Količina proteina (% ukupnih proteina) | Količina proteina (g/100g suhog albumena) |
|---|---|---|---|
| Ukupnih proteina | - | 100 | 9,7-10,6 |
| Ovomukoid | Gal d1 | 11 | 1,17 |
| Ovoalbumin | Gal d2 | 54 | 5,72 |
| Ovotransferin | Gal d3 | 12 | 1,27 |
| Lizozim | Gal d4 | 3,5 | 0,37 |

Pojava alergije na proteine jaja i iznad svega na ovalbumin među stanovništvom je u odraslih oko 0,3%. Ako pretpostavimo da je koncentracija ovoalbumina u vinu 1 ug / L, to bi odgovaralo dnevnom unosu od 1 µg ovoalbumina. Ova razina je ispod najnižih doza koje izazivaju negativne reakcije na jaja alergičnih pojedinaca.

EFSA (European Food Safety Agency) smatra da vina kod kojih se kao sredstvo za bistrenje koristio ovoalbumin mogu izazvati različite neželjene reakcije kod potrošača sklonih alergijama (EFSA, 2007).

Kasnijim istraživanjima donesen je službeni stav da iako su se metode za detekciju ovoalbmina u vinu znatno poboljšale, nema dovoljno informacija o koncentracijama zaostataka ovoalbumina ili drugih alergena iz jaja koji se mogu pronaći u komercijalnim vinima. Ponovno se
donosi zaključak da vina kod kojih se kao sredstvo za bistrenje koristio ovoalbumin mogu izazvati različite neželjene reakcije kod potrošača sklonih alergijama (EFSA, 2011).

Istraživanjem 2014. godine dokazano je da bijela i crna vina tretirana maksimalnom preporučenom dozom ovoalbumina, filtrirana dijatomejskom zemljom prije punjenja u boce pokazuju negativne rezultate ELISA testova. U slučajevima kada se koristi dvostruka preporučena doza u bijelom vinu dobiven je rezultat od 0,36ppm što je 0,11ppm vise od maksimalno dozvoljene granice. I crvena i bijela vina bistrena s ovoalbuminom, ali ne filtrirana, često daju negativne ELISA rezultate, međutim, neka vina su imala pozitivne vrijednosti do 1,5 ppm. Vinari koji žele nefiltrirana vina puniti u boce trebaju analizirati vina, kako bi se utvrdilo da li je oznaka na deklaraciji za njih nužnost (Webber Witt, 2014).

Istraživanjima 2015.godine potvrđeno je da vino može sadržavati proteine bjelanjaka u tragovima kada se proizvođači ne drže dobre proizvođačke prakse. Nakon korištenja bentonita ili filtracije alergeni u vinu nisu utvrđeni ELISA testovima, a alergični ispitanici nisu reagirali niti na ubodne niti oralne testove s tako obrađenim vinima (Deckwart i sur., 2015).

ELISA test je najvažnija analitička metoda koja se primijenjuje za otkrivanje alergena u hrani, zbog svoje specifičnosti i osjetljivosti, a potrebna oprema nije skupa. To naravno ne znači da se ne ispituju i druge metode koje bi se pokazale učinkovitijima. U posljednjih nekoliko godina postoji više studija u kojima se primjenjuje masena spektrometrija (MS) za otkrivanje ostataka proteina jaja u vinima iz proizvoda za bistrenje.

Tollin i sur. su analizirali panel od 25 komercijalnih talijanskih vina bistrenih dozama bjelanjka već od 5 g / hl tekućinskom kromatografijom u kombinaciji s tandem MS (LC-MS / MS) kako bi otkrili tragove proteina bjelanjaka. Našli su ovalbumin u osam proučavanih vina, dok je alergen ovotransferrin identificiran je u dva od njih. Na temelju granica detekcije metode, minimalna količina proteina bjelanjaka u istraživanim vinima procjenjuje se na 100 ng / L (Tollin i sur., 2012).

Mattarozzi i sur. (2014) su također predložili LC-MS / MS metodu za simultano određivanje ostataka ovoalbumina i mliječnih kazeina u crnom vinu.

Prema novim europskim propisima, izuzeće označavanja na vinu može se održati samo ako: se ne koriste proteini bjelanjaka i mogućnost kontaminacije je pod kontrolom ili se vino iz-

bistri s takvim proizvodima koji su negativni na prisutnosti ostataka poteina bjelenjaka, utvrđeno primjenom tehnika za otkrivanje i kvantificiranje s granicama 0,25 mg / L, i 5 mg / L (Penas i sur., 2015).

*Lizozim*

Lizozim nije sredstvo za bistrenje, ali je spoj koji se dobiva iz bjelanka kokošjih jaja i dodaje kao aditiv u vina. On se uglavnom koristi u bijelim vinima kako bi se izbjegla malolaktična fermentacija, za održavanje svježine vina i izbjegle druge arome koje dolaze od malolaktične fermentacije, ali se isto tako može se koristiti i u crvenim vinima. Lizozim može smanjiti potrebu za sulfitima što posljedično utječe na smanjenje biogenih amina (Liburdi i sur., 2014). Neke tvari u vinu uzrokuju smanjenje aktivnosti lizozima, te uvjeti vinifikacije značajno utječu na uspješnost njegove primjene (Azzolini i sur., 2010) Prema zakonskoj regulativi za koncentraciju kojom mošt i vino mogu biti tretirani s lizozimom iznosi 500 mg/L, a ako se dodaje i moštu i vinu ukupna dodana količina ne smije biti veća od 500 mg/L ( Pravilnik, 2010). Studije pokazuju da je iznos od 125/250 mg lizozima / L dovoljan za stabilizaciju vina nakon malolaktične fermentacije. Zbog poznate alergenosti lizozim mora biti naznačen na etiketi vina ako je prisutna u konačnom proizvodu ne samo unutar Europske zajednice, već i u drugim zemljama kao što su Japan, zemlje Oceanije i Sjedinjenih Američkih Država (Webber Witt, 2014).

***Mlijeko***

Mnoge vrste mlijeka se mogu korstiti kao materijal za bistrenje: obrano ili punomasno mlijeko, mliječni kazein, natrij kazeinat i proteini sirutke (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). U vinskoj industriji, europskim zakonodavstvom ovaj materijal je prihvaćen kao sredstvo za bistrenje 1978. godine, ali se koristi u mnogim zemljama već prije tog datuma (Uredbom 1861/78 EEZ). Sva mliječna sredstva za bistrenje su opisana kao da se koriste uglavnom za unapređenje boje i okusa bijelih vina. Kazein u kombinaciji s natrijevim ili kalijevim ionima formira topljivi kazeinat koji se lako otapa u vinu. Kazein se u velikim koiličinama koristi u proizvodnji vina u mnogim zemljama, u Njemačkoj i do 20%, a u Francuskoj oko 40% vina, što iznosi preko 20,5 milijuna hektolitara. Ova sredstva za bistrenje imaju "osvježavajući" učinak na njihovu boju i okus, te se primjenjuje kao tradicionalni tretman za bijela vina i to za uklanjanje fenolne gorčine, omekšanje okusa, uklanjanje grubosti i disbalansa okusa. Poput

proteina jaja, kazeinati imaju korisna enološka svojstva, ali svaki zaostatak u izbistrenim vinima može predstavljati rizik za rijetke pojedince koji pate od alergije na mlijeko u odrasloj dobi. Mlijeko sadrži nekoliko alergenih bjelančevina navedenih u Tablici 5, ali samo se kazeinati obično dodaju u vina. Stoga konačan zaključak EFSA panela o kazeinu / kazeinatu / mlijeku je da ti proizvodi mogu izazvati negativne reakcije kod osjetljivih pojedinaca (EFSA, 2011b).

Tablica 5. Glavni alergeni u kravljem mlijeku (Penas i sur., 2015)

| **Protein** | Internacionalni alergijski kod | Sadržaj proteina (% ukupnih proteina) | Sadržaj proteina (g/100g suhog mlijeka) |
|---|---|---|---|
| Ukupni protein | - | 100 | 26,15 |
| Alfa- laktalbumin | Bos d 4 | 5 | 1,31 |
| Beta- laktoglobulin | Bos d 5 | 10 | 2,62 |
| Serum Albunin | Bos d 6 | 1 | 0,26 |
| Imunoglobulin | Bos d 7 | 3 | 0,78 |
| Ukupni kazein | Bos d 8 | 80 | 20,92 |
| AlfaS1-kazein | Bos d 9 | 29 | 7,58 |
| AlfaS2-kazein | Bos d 10 | 8 | 2,09 |
| Beta-kazein | Bos d 11 | 27 | 7,06 |
| Kappa-kazein | Bos d 12 | 10 | 2,62 |

Kao i kod jaja, ELISA test je najučestalija analitička metoda za detekciju kazeina ili drugih mliječnih proteina u vinu. Restani i suradnici (2012.) rade istraživanje prilagođenim ELISA testovima kojima potvrđuju da je u 64 ispitana talijanska komercijalna vina pronađeno manje od 0,28ppm kazeinskih ostataka, što ide u prilog sigurnosti vina.

Lifrani i sur. (2009) su proučavali 400 vina, pripremljenih u laboratoriju i komercijalno dostupnih, i našli kazeinate u obje vrste vina i pomoću ELISA testa. Vina s pozitivnim

ELISA rezultatima su ubrizgavana u miševe senzibilizirane na kazeinat i nije uočena anafilaktička reakcija.

U nedavnom istraživanju, Deckwart i sur. (2014) su na rezultatima ELISA testova primjetili zanemarive koncentracije zaostalih alergijskih proteina u eksperimentalnim crvenim i bijelim vinima bistrenim s kazeinom iz različitih komercijalnih izvora

Kirschner i sur. (2009) su podvrgnuli pet osoba s mliječnom alergijom na test sa pet eksperimentalnih vina izbistrenih s kalijevim kazeinatom, dozom pet puta višom nego što se obično primjenjuje u komercijalnim vinima. Nije primijećena nikakva klinička reakcija nakon konzumiranja 200-300 ml vina.

Istaživanje LC-MS/MS metodom na talijanskim komercijalnim vinima daje rezultate u kojima je u svakom uzorku vina identificirano nekoliko proteina, uključujući i proteine iz bobica grožđa, vinskih kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), bakterija (*Oenococcus oeni)* i plijesni (*Botrytis cinerea*). Važno je istaknuti da je u 8 vina utvrđeno da sadrže peptide koji pripadaju jajima i mliječne bjelančevine, svi od njih su poznati kao potencijalni alergeni. Konkretno, ovoalbumin, glavni allergen jaja, otkriven je u svih 8 pozitivnih vina, a dva od njih su također sadržavala mliječne alergene alfa i beta kazein (Tollin i sur., 2012).

Metoda temeljena na masenoj spektrometriji visoke razlučivosti je razvijena za simultano određivanje sredstava za bistrenje koja sadrže potencijalno alergene proteine mlijeka (kazein) i bjelanjaka (lizozim i ovoalbumin) kod komercijalnih bijelih vina na razini sub-ppm (Monaci i sur., 2013).

***Riba***

Protein ribljeg mjehura (Isinglass) je protein dobiven iz mjehura tropskih riba, otapanjem u organskim kiselinama, a sastoji se uglavnom od proteina kolagena- oko 70%. Glavni protein ribljeg mjehur su navedeni u tablici 6.

Isinglass se koristi u vinarstvu za čišćenje bijelih vina s niskim fenolnim sadržajem jer se fenoli i boja jedva uklanjaju ovim sredstvom. Štoviše, uklanja laganu grubost ili disbalans okusa u vinu (Ribéreau-Gayon I sur. 2006; Webbeer Witt, 2014).

Tablica 6. Glavni proteini ribljeg mjeura i njihov alergijski potencijal (EFSA, 2007)

| Protein | Alergijski potencijal | Proteinski sasrav |
|---|---|---|
| Parvalbumin | Visok | 0,2-0,7mg/kg isinglass-a |
| Tip I + kolagen i želatina kao produkt denaturacije kolagena | Nizak | 95% suhe mase |
| Elastin | Nizak | 2,5% suhe mase |

Ova se supstanca koristi u velikim količinama u proizvodnji vina, samo u Francuskoj oko 8,2 milijuna hektolitara se bistre s protenima ribljeg mjehura. Ipak je izuzet s deklaracija u Europi i inozemstvu, a ne postoji ni zakonska granica za tu tvar u vinu. Alergije povezane s ribom utječu na 0,2% -2,2% europskog stanovništva. Riba može uzrokovati teške reakcije u alergičnih pojedinaca. Logičnim slijedom provedena su ispitivanja i o reziduama ribljih proteina u vinima od strane EFSA. Navedeno je da ne postoje slučajevi niti izvješća o bilo kakvim anafilaktičkim reakcijama u bolesnika s poznatom alergijom na ribu koja bi se mogla pripisati zaostalim proteinima ribljeg mjehura u vinu. Ipak, većina ljudi, uključujući i medicinsko osoblje, vjerojatno neće biti svjesno da se riblji proteini koriste tijekom proizvodnje vina. Dakle, postoji mogućnost neprijavljenih reakcija uzrokovanih proteinima ribljeg mjehura.

Zaključeno je da dostavljeni podaci dopuštaju da njihovo vijeće uzme u obzir da je vjerojatnost da protein ribljih mjehura koji se koriste kao sredstvo u bistrenju vina izazove alergijsku nuspojavu u osjetljivih pojedinaca zanemariva, u odgovarajućim uvjetima korištenja. Korištenje proteina ribljeg mjehura u vinu je dopušteno bez potrebe za izjavu na etiketi (EFSA, 2007b.).

# ZAKLJUČAK

Na osnovu naprijed iznesenih spoznaja može se zaključiti:

- Alergija je reakcija preosjetljivog organizma ili organa na susret antigena s prethodno stvorenim specifičnim antitijelima. Razlikujemo alergije od intolerancije ili preosjetljivosti na hranu.
- Europska komisija je 2003. godine izdala Direktivu 2003/89 / EC - kao "Direktivu za označavanje alergena".
- Vino je kompleksan sustav čij se alergijski potencijal još uvijek istražuje.
- Spojevi sa sumporom svrstavaju se među najpoznatije alergene spojeve u vinu i smatraju se da su glavni uzročnici za napade astme inducirane vinom, iako dosad objavljena literatura nudi jako malo dokaza za tu teoriju.
- Zbog alergijskog potencijala, postalo je vrlo važno pitanje u kojoj mjeri ostatci sredstava za bistrenje uzrokuju alergijske reakcije kod potrošača. Najčeće korištena, potencijalno alergena, sredstva za bistrenje su jaja, mlijeko i riblja želatina
- Korištenjem novih tehnologija može se izbjeći korištenje određenih proteina za bistrenje. Vinari također mogu utjecati smanjenjem uporabe sredstava za bistrenje i na taj način jamčiti kvalitetu proizvoda. Najjednostavnije riješenje je da uporaba potencijalnih alergena bude naglašena u deklaraciji proizvoda.
- Lizozim se smatra relatvno sigurnim dodatkom vinu. Koristi se kao antimikrobno sredstvo, kao prirodna i učinkovita alternativa za smanjenje upotrebe sulfita i pridonosi smanjenju koncentracije biogenih amina. Ipak, lizozim je također istaknut kao jedan od potencijalnih alergena jaja.
- ELISA test se smatra osnovnom metodom za detekciju rezidua sredstava za bistrenje u vinu, ali su sve više u primjeni suvremene i pouzdanije analitičke metode.

# 3 LITERATURA


1. Azzolini M, Tosi E, Veneri G, Zapparoli G. (2010) Evaluating the efficacy oflysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios., *S Afr J Enol Vitic 31:99–105.*
2. Bulat-Kardum Lj., (2013) Alergija - moderna epidemija, *Medicus* ; 22(2):79-82
3. Christmann M. (2001): Oenologie Aktuell, Neue oenologische Verfahren –Detaillierte Darstellung der wichtigstens Techniken, Meininger Verlag, Neustadt / Weinstraße
4. Christmann M. and Freund M. (2004): Oenologie aktuell - Moderne Mostvorklärung. Meininger Verlag, Neustadt / Weinstraße
5. Codex alimentarius (1997): Food Hygiene Basic Texts – Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Rome
6. Colić-Barić I., (2009) Alergeni u hrani, Znanstveni odbor za prehranu, alergene i hranu za posebne prehrambene potrebe , PBF Zagreb.
7. Deckwart, M.; Carstens, C.; Webber-Witt, M.; Schäfer, V.; Eichhorn, L.; Kang, S.; Fischer, M.; Brockow, K.; Christmann, M.; Paschke-Kratzin, A., (2014) Development of a sensitive ELISA for the detection of casein-containing fining agents in red and white wines., *J. Agric. Food Chem*. 2014, 62, 6803–6812
8. Dietrich H.H., Grossman M., (2005) Mikrobiologija vina, 3. revidirano izdanje. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
9. EC (2000). Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. Official Journal of the European Union L 109/29, 6 May 2000.
10. EC (2003). Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs. Official Journal of the European Union L 308/15, 25 November 2003.
11. EC (2005). Directive 2005/26/EC of 21 March 2005 establishing a list of food ingredients or substances provisionally excluded from Annex IIIa of the Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union L 75/33, 23 March 2005.
12. EC (2007). Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa of the

Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. Official Journal of the European Union L 310/11, 28 November 2007.

13. EC (2010). Directive 2010/1266/EC of 22 December 2010 amending Directive 2007/68/EC as regards labelling requirements for wines. Official Journal of the European Union L 347/27, 31.12.2010
14. EEZ (1978) : Uredba Vijeća br 1861/78 od 25. srpnja 1978. kojom se dopunjuje Uredba (EEZ-a ) br 816/70 kojom se utvrđuju dodatne odredbe za zajedničkoj organizaciji tržišta vina
15. EFSA (2004): Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. The EFSA Journal 32:1-197.
16. EFSA (2007 a): Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the WFA and AWRI on the ovalbumin (egg white) used in manufacture of wine pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13EC-for permanent exemption from labeling. The EFSA Journal 566:1-7
17. EFSA (2007 b): Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from WFA and AWRI on fish products (isinglass) used in the manufacture of wine pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC - for permanent exemption from labeling. The EFSA Journal 535:1-9
18. EFSA (2011 a): Scientific opinion related to a notification from the International Organisation of Vine and Wine (OIV) on ovalbumin/egg white to be used in the manufacture of wine clarification processing aids as Pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC -for permanent exemption from labeling. The EFSA Journal 9(10), 2385
19. EFSA (2011 b): Scientific Opinion related to a notification from the International Organisation of Vine and Wine (OIV) on casein/caseinate/milk products to be used in the manufacture of wine as clarification processing aids pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labeling. The EFSA Journal 9 (10), 2384
20. Ertan Anlı R., Bayram M., (2008) Biogenic Amines in Wines, *Food Rev Int*, 25:1, 86-102, DOI: 10.1080/87559120802458552

21. Jaeckels N., Bellinghausen I., Fonk P., Solga J., Decker H., (2015) Assessment of sensitization to grape and wine allergens as possible causes of adverse reactions to wine: a pilot study, Clinical and Translational Allergy (2015) 5:21, DOI 10.1186/s13601-015-0065-8
22. Kirschner, S.; Belloni, B.; Kugler, C.; Ring, J.; Brockow, K., (2009) Allergenicity of wine containing processing aids: A double-blind, placebo-controlled food challenge., *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol*. 2009, 19, 210–213.
23. Liburdi, K.; Benucci, I.; Esti, M. Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications., *Compr. Rev. Food Sci. F*. 2014, 13, 1062–1073.
24. Lifrani, A.; Dos Santos, J.; Dubarry, M.; Rautureau, M.; Blachier, F.; Tome, D., (2009) Development of animal models and sandwich-ELISA tests to detect the allergenicity and antigenicity of fining agent residues in wines., *J. Agric. Food Chem*. 2009, 57, 525–534
25. Lugović-Mihić L., Šešerko A., Duvančić T., Šitum M., Mihić J., (2012), Intolerancija na histamin – koje su moguće posljedice na koži, *Acta Med Croatica*, 66 (2012) 375-381
26. Marques A. P., Leitao M.C., San Romano M.V. (2008) Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors, *Food Chem* 107 (2008) 853–860
27. Maintz L., Novak N. (2007) Histamine and Histamine intolerance, *Am J Clin Nutr* 2007;85:1185–96.
28. Mattarozzi, M.; Milioli, M.; Bignardi, C.; Elviri, L.; Corradini, C., (2014) Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in fortified red wine., *Food Control* 2014, 38, 82–87
29. Monaci L., Losito I., Palmisano F., Visconti A. (2010) Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography–Electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4300–4305
30. Monaci L., Losito I., de Angelis E., Pilolli R., Visconti A., (2013) Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white wines by high-resolution mass spectrometry., *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 27, 2009-2018
31. Moreno-Ariibas M..V., Polo M.C., (2009): Wine chemistry and Biochemistry. Springer Science and Business Media. LLC, 233, New York

32. Narodne Novine (117/2003), Odluka Hrvatskog Sabora o proglašenju Zakonu o hrani na sjednici 14. Srpnja 2003., Broj: 01-081-03-2623/2, Zagreb, 18. srpnja 2003.
33. Narodne Novine (114/2004), Pravilnik o općem deklariranju ili označavanju hrane, Zagreb, 2004
34. Narodne Novine (34/2005), Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o deklariranju ili označavanju hrane, Zagreb 2005
35. Palmisano G., Antonacci D., and Larsen M. R., (2010) Glycoproteomic Profile in Wine: A 'Sweet' Molecular Renaissance. *J Proteome* Res 9:6148-6159
36. Pastorello E.D., Farioli L., Pravettoni V., Ortolani C., Fortunato D., Giuffrida M., Perono Garoffo L., CalamariA.M., Brenna O., Conti A. (2003), Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin, *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:350-9.
37. Popović D, Kuzmanovski B., (2009) Alergeni u hrani, (http://www.tehnologijahrane.com/hemijahrane/alergeni-u-hrani), preuzeto 7.6.2016.
38. Penas E., di Lorenzo C., Uberti F., Restani P., (2015) Allergenic Proteins in Enology: A Review on Technological Applications and Safety Aspects, *Molecules* 2015, 20, 13144-13164
39. Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima (2010) Narodne novine 114, Zagreb.
40. Pravilnik o općem deklariranju ili označavanju hrane, Narodne novine 114, 2004. Zagreb (NN 114/04)
41. Ribéreau-Gayon, P.; Glories Y.; Maujean A .i Dubordieu D. (2006): Handbook of enology. Volume 2 – The Chemistry of wine - Stabilization and treatments, John Wiley & Sons Ltd. West Sussex.
42. Restani P., Uberti F., Danzi R., Ballabio C., Pavanello F., Tarantino C., (2012) Absence of allergenic residues in experimental and commercial wines fined with caseinates, *Food Chemistry* 134 (2012) 1438–1445
43. Sampson H. A. (2004): Update on food allergy., *J Allergy* Clin Immunol Year 113, NR 5:805–819
44. Tollin S., Pasini G., Simonato B., Mainete F., Arrigoni G. (2012), Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens, *Food Control* 28, 321-326
45. Vally H., Thompson P.J. (2001): Role of sulfide additives in wine induced asthma:

single dose and cumulative dose studies. Thorax; 56:763-9

46. Webber Witt, M. (2014) Allergic potential of wine fining material from animal proteins; milk and egg. Doctoral thesis, Justus-Liebig University Giessen i Hochschule Geisenheim University.
47. Wigand P., Deccker H. (2011): Wine Proteins - Food Allergy Through Wine., *Akt. Dermatol* 37(1/02):42-46
48. Wigand P.; Blettner M., Sologa J., Decker H. (2012): Prevalence of wine intolerance: results of a survey from Mainz, Germany., *Dtsch Arztebl Int* 109(25): 437-44