



RESOLUCIÓN OIV-OENO 529-2017

EVIDENCIA DE LA QUITINASA Y LAS PROTEÍNAS DEL TIPO TAUMATINA EN VINOS BLANCOS

LA ASAMBLEA GENERAL,

Visto el artículo 2, párrafo 2 iv, del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A propuesta de la Subcomisión “Métodos de Análisis”,

DECIDE completar el Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos con el método siguiente:

EVIDENCIA DE LA QUITINASA Y LAS PROTEÍNAS DEL TIPO TAUMATINA EN VINOS BLANCOS (método de tipo IV)

1. Introducción

Muchas de las pruebas que se utilizan para detectar las proteínas inestables y quiebra proteica en vinos blancos se basan en la aplicación de calor o en el uso de precipitantes. Estas pruebas arrojan resultados muy heterogéneos, poco fiables e incluso contradictorios.

Este método semicuantitativo de inmunopresión permite determinar la presencia o ausencia de proteínas inestables en el vino. Concretamente permite detectar las proteínas del tipo taumatina y la quitinasa en el vino a partir de una concentración global de 1 mg/L. Este valor se ha obtenido comparando los resultados con el método de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS descrito en el Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos (OIV-MA-AS315-12) y cuyo límite de detección es de 1 mg/L.

2. Ámbito de aplicación

Este método inmunológico de inmunopresión se aplica a los vinos blancos.

3. Fundamento

El método de inmunopresión consta de 3 etapas:

3.1 Depósito de la muestra de vino en una membrana de nitrocelulosa

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

3.2 Detección de las proteínas inestables

3.3 Revelado de la presencia de las proteínas inestables

La intensidad de las manchas coloreadas observadas en la membrana es proporcional a la cantidad de proteínas inestables y al riesgo de quiebra proteica del vino.

4. Reactivos y productos

4.1 Lista de reactivos y productos

A menos que se indique lo contrario, los productos se utilizarán tal y como se comercializan:

- 4.1.1 Agua ultrapura: resistividad $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ a 25 °C
- 4.1.2 Vino muy rico en proteínas y vino sin proteínas tras un tratamiento con bentonita. Estos vinos se usarán como control positivo y negativo, respectivamente. La verificación y la cuantificación de las proteínas presentes en estos vinos podrán llevarse a cabo por electroforesis SDS-PAGE (método OIV-MA-AS315-12)
- 4.1.3 Anticuerpos policlonales obtenidos en conejos, dirigidos contra las proteínas inestables del vino (véase el protocolo del anexo)
- 4.1.4 Anticuerpos policlonales obtenidos en cabras, dirigidos contra los anticuerpos IgA de conejo acoplados a la peroxidasa de rábano picante (en adelante, “anticuerpos anticonejo de cabra marcados con HRP”)
- 4.1.5 Cloruro sódico anhidro (NaCl) [CAS 7647-14-5]
- 4.1.6 Tris-HCl anhidro [CAS 1185-53-1]
- 4.1.7 HCl concentrado en solución; pureza $\geq 36,5 \%$ [CAS 7647-01-0]
- 4.1.8 Tween 20 [CAS 9005-64-5]
- 4.1.9 Albúmina de suero bovino (ASB) en polvo liofilizado; pureza $\geq 96 \%$ [CAS 9048-46-8]
- 4.1.10 4-Cloro-1-naftol; pureza $\geq 99 \%$ [CAS 604-44-4]
- 4.1.11 Metanol; pureza $\geq 99,8 \%$ [CAS 67-56-1]
- 4.1.12 Agua oxigenada en solución (H_2O_2); pureza $\geq 30 \%$ [CAS 7722-84-1]

4.2 Preparación de las soluciones de trabajo

Todas las soluciones pueden conservarse 1 año a 4 °C.

4.2.1 Solución amortiguadora TBS (Tris Buffered Saline)

Disolver 29,22 g de cloruro sódico (4.1.5) y 2,42 g de Tris-HCl anhidro (4.1.6) en 1 litro de agua ultrapura (4.1.1). Ajustar el pH a 7,5 con una solución concentrada de HCl (4.1.7).

4.2.2 Solución amortiguadora TBS-Tween 20

Añadir un 0,05 % de Tween 20 (4.1.8) a la solución amortiguadora TBS (4.2.1).

4.2.3 Solución de bloqueo

Añadir un 4 % de ASB (4.1.9) a la solución amortiguadora TBS (4.2.1).

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

4.2.4 Solución de anticuerpos policlonales (comerciales u obtenidos según el protocolo que se describe en el anexo)

4.2.4.1 Diluir los anticuerpos policlonales frente a proteínas inestables (primarios) en una solución amortiguadora TBS (4.2.1), según se indique en las instrucciones comerciales o en función de su valor cuantitativo.

4.2.4.2 Diluir los anticuerpos policlonales anticonejo de cabra marcados con HRP (secundarios) en una solución amortiguadora TBS (4.2.1), según se indique en las instrucciones comerciales o en función de su valor cuantitativo.

4.2.5 Soluciones para revelar las proteínas inestables

4.2.5.1 Disolver 30 mg de 4-cloro-1-naftol (4.1.10) en 10 mL de metanol (4.1.11). Conservar esta solución a -20°C en un entorno sin luz hasta su utilización.

4.2.5.2 Añadir 30 μL de H_2O_2 (4.1.12) a 50 mL de TBS (4.2.1) justo antes de usar.

5. Material

5.1 Lista del material necesario para la reacción de inmunopresión

5.1.1 Membrana de nitrocelulosa con poros de 0,2 μm para realizar la inmunopresión

5.1.2 Pipetas automáticas de 0,5 a 10 μL y de 100 a 1000 μL , y las puntas correspondientes

5.1.3 Tubos, gradilla para las diluciones de los anticuerpos

5.1.4 Probetas graduadas de clase A

5.1.5 Papel absorbente

5.1.6 Pinza de precisión con muelle

5.1.7 Material de vidrio de laboratorio para la reacción (cristalizador pequeño, placa de Petri, tubos, tapones, etc.)

5.1.8 Agitador de bandeja (para las placas) o rotativo (para los tubos) con una velocidad máxima de 20 rpm.

5.2. Material necesario para preparar las disoluciones

5.2.1 Matraces aforados de clase A

5.2.2 pHmetro

5.2.3 Balanza de precisión con una sensibilidad de 0,1 mg

5.2.4 Centrífuga a 3000 g y tubos de centrífuga

6. Muestreo

Las muestras deberán tomarse y conservarse a 4°C para evitar alteraciones en las proteínas presentes de forma natural en el vino.

6.1 Preparación de la muestra

Las muestras (o muestras de laboratorio) de vino se depositan directamente en la membrana de nitrocelulosa (5.1.1) con una pipeta (5.1.2), sin preparación previa.

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

7. Procedimiento

El análisis puede aplicarse a vinos sin filtrar, siempre y cuando no contengan bentonita en suspensión. En tal caso, primero se deberá centrifugar a 3000 g (5.2.4) durante 10 minutos y a temperatura ambiente.

Según se indica en el apartado 3, el método de inmunoprecipitación consta de 3 etapas. Las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente (entre 18 °C y 25 °C).

7.1 Depósito de la muestra de vino

Depositar alícuotas de 5 µL (5.1.2) de las muestras y de las soluciones de control en la membrana de nitrocelulosa (5.1.1).

Dejar secar de 15 a 20 min a temperatura ambiente.

7.2 Adición de los anticuerpos monoclonales

7.2.1 Colocar la membrana en la placa o en el tubo (5.1.7). El volumen de las soluciones dependerá del recipiente y del tamaño de la membrana, que deberá quedar cubierta.

Los volúmenes que se indican a continuación son para un recipiente del tipo placa de Petri pequeña (5.1.7).

Añadir la solución de bloqueo (4.2.3). Agitar durante 30 minutos como mínimo (5.1.8).

7.2.2 El lavado se efectuará de la siguiente manera: eliminar la solución sujetando la membrana, con una pinza en caso necesario. Añadir 20 mL de TBS (4.2.1) y agitar durante varios minutos (5.1.8). Repetir el lavado y eliminar la solución.

7.2.3 Añadir 20 mL de la solución de anticuerpos primarios (4.2.4.1).

Agitar durante una hora (5.1.8).

Lavar tres veces con la solución TBS-Tween 20 (4.2.2).

7.2.4 Añadir 20 mL de la solución de anticuerpos secundarios anticonejo de cabra marcados con HRP (4.2.4.2).

Agitar durante una hora.

7.2.5 Lavar durante 5 minutos con la solución TBS-Tween 20 (4.2.2) siguiendo las indicaciones anteriores.

Lavar dos veces durante 15 minutos con la solución TBS (4.2.1) siguiendo las indicaciones anteriores. Eliminar la solución.

7.3 Revelado de la presencia de las proteínas inestables

7.3.1 Mezclar las dos soluciones para revelar las proteínas inestables (4.2.5.1 y 4.2.5.2), poner en contacto con la membrana (5.1.1) en la que se ha depositado el vino (según el protocolo descrito en los apartados 7.1 y 7.2) y agitar.

Aparecerá un precipitado de color negro-morado a violeta claro en aquellos puntos de la membrana en los que estén presentes las proteínas inestables.

La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas inestables y, por lo tanto, al riesgo de quiebra proteica.

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Transcurridos 20-30 minutos, cuando la mancha correspondiente al depósito de la solución de control positivo (4.1.2) sea muy intensa, detener la reacción de coloración lavando la membrana de nitrocelulosa (5.1.1) con agua.

Poner la membrana a secar entre dos hojas de papel absorbente (5.1.5).

Los resultados podrán interpretarse cuando la membrana esté seca.

8. Resultados

Para poder interpretar los resultados de la reacción:

- en el punto de depósito de la solución colorimétrica de control positivo deberá observarse una mancha muy intensa (morado-negro),
- en el punto de depósito de la solución colorimétrica de control negativo no deberá observarse ninguna mancha,
- las partes de la membrana en las que no se haya depositado ninguna muestra (ruido de fondo) deberán ser blancas o muy claras.

Se puede obtener un resultado semicuantitativo mediante una curva de calibrado elaborada a partir de una serie de diluciones de un vino naturalmente rico en proteínas. Esta curva de calibrado será función de las superficies obtenidas por integración de la intensidad de las manchas que corresponden a la formación de los inmunocomplejos. El análisis puede realizarse con el mismo equipo que se utiliza para analizar los geles de electroforesis descritos en el método OIV-MA-AS315-12.

La interpretación de los resultados también puede efectuarse visualmente.

8.1 Para efectuar un control directo de la presencia o ausencia de proteínas inestables en el vino

La muestra de laboratorio contiene proteínas si la intensidad de la mancha obtenida es mayor que la de la mancha de la solución de control negativo.

La intensidad de la mancha obtenida tras la reacción es proporcional a la cantidad de proteínas inestables y, por lo tanto, proporcional al riesgo de quiebra proteica del vino.

8.2 Para comprobar la ausencia de proteínas tras un tratamiento (de bentonita en particular)

La muestra contiene proteínas si la mancha correspondiente a la muestra analítica no tratada con bentonita es más intensa que la mancha de la solución colorimétrica de control negativo.

En el caso de la aplicación experimental de una serie de concentraciones de un producto clarificante (bentonita), la intensidad de las manchas de cada muestra analítica será menor cuanto mayor sea la concentración de producto. La dosis de producto con la que se obtiene una mancha de intensidad nula o mínima, pero constante en relación con los demás puntos de la serie, es la que deberá aplicarse para lograr la estabilidad proteica del vino analizado.

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

9. Anexos

Producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas inestables

Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas inestables de los vinos blancos y rosados pueden obtenerse en conejos. La fiabilidad y precisión del método se debe a la especificidad de los anticuerpos.

9.1 Purificación de las quitinasas y las proteínas del tipo taumatina

9.1.1 Lista de productos y materiales

- 9.1.1.1 Agua ultrapura: resistividad $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 9.1.1.2 Uva de vinificación vendimiada en el punto madurez tecnológica (de las variedades chardonnay o sauvignon blanc, por ejemplo)
- 9.1.1.3 Acetato sódico anhidro [CAS 127-09-3]
- 9.1.1.4 Tritón X-100 [CAS 9002-93-1]
- 9.1.1.5 Sulfato de amonio anhidro [CAS 127-09-3]
- 9.1.1.6 Cloruro sódico anhidro (NaCl) [CAS 7647-14-5]
- 9.1.1.7 Tris-HCl anhidro [CAS 1185-53-1]
- 9.1.1.8 Ácido clorhídrico al 37 % [CAS 7647-01-0]
- 9.1.1.9 Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M [CAS 1310-73-2]
- 9.1.1.10 Material de vidrio de laboratorio (matraces aforados y pipetas de clase A)
- 9.1.1.11 Pinza de precisión con muelle
- 9.1.1.12 Centrífuga a 10 000 g
- 9.1.1.13 Balanza de precisión con una sensibilidad de 0,1 mg
- 9.1.1.14 pHmetro
- 9.1.1.15 Resina aniónica fuerte
- 9.1.1.16 Resina aniónica
- 9.1.1.17 Membrana de 10 kDa de umbral de corte
- 9.1.1.18 Cromatógrafo de líquidos de baja presión con columna y bomba de gradiente de concentración
- 9.1.1.19 Detector para medir la absorbancia a 280 nm
- 9.1.1.20 Detector conductimétrico

9.1.2 Preparación de la solución amortiguadora de acetato sódico (9.1.1.3) diluido 50 mM y con 0,25 % de Tritón X-100 (9.1.1.4) a pH 5.

En un matraz aforado de 1 L (9.1.1.10):

- verter 4,1 g de acetato sódico (9.1.1.3),
- añadir 2,5 g de Tritón X-100 (9.1.1.4),
- llevar a 1 L con agua ultrapura (9.1.1.1) y agitar; ajustar el pH a 5 con HCl al 37 % (9.1.1.8), dado que el pH básico afecta negativamente a las proteínas y complica su extracción.

9.1.3 Preparación de la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

En un matraz aforado de 1 L (9.1.1.10):

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

- verter 7,9 g de Tris HCl anhidro (9.1.1.7),
- llevar a 1 L con agua ultrapura (9.1.1.1) y ajustar el pH a 8 con una solución de NaOH 1M (9.1.1.9).

9.1.4 Preparación de la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, 100 mM de NaCl

En un matraz aforado de 1 L (9.1.1.10):

- verter 7,9 g de Tris HCl anhidro (9.1.1.7),
- añadir 5,8 g de cloruro de sodio anhidro (9.1.1.6),
- llevar a 1 L con agua ultrapura (9.1.1.1) y agitar.

9.1.5 Preparación de la solución de cloruro sódico 100 mM

En un matraz aforado de 1 L (9.1.1.10):

- Verter 5,8 g de cloruro de sodio anhidro (9.1.1.6),
- llevar a 1 L con agua ultrapura (9.1.1.1) y agitar.

9.2 Procedimiento

Recoger uvas maduras de las variedades pinot noir o chardonnay y congelar a -20°C . Retirar las pepitas de las bayas congeladas antes de triturarlas. Triturar 3 g de bayas sin pepitas en 10 mL de solución amortiguadora de acetato sódico (9.1.2) diluido 50 mM, pH 5, con 0,25 % de Tritón X-100 (9.1.1.4).

Extraer el material insoluble por centrifugación (5 min a 3000 g) (9.1.1.12). Congelar el sobrenadante (2 mL) a -20°C durante una noche para clarificar. Centrifugar el extracto a 10 000 g durante 15 min para eliminar el material insoluble.

Añadir sulfato amónico (9.1.1.5) al sobrenadante hasta alcanzar una concentración del 30 %. Agitar la mezcla durante 1 hora a 4°C y centrifugar de nuevo siguiendo las indicaciones anteriores.

Añadir otra vez sulfato amónico (9.1.1.5) al sobrenadante hasta alcanzar una concentración final del 60 %. Agitar la mezcla durante 2 horas a 4°C y centrifugar de nuevo siguiendo las indicaciones anteriores.

Recoger el precipitado proteico y volver a disolver en 1 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Fijar las proteínas en una columna con una resina aniónica fuerte (5×30 cm) (9.1.1.15). Lavar la columna con la solución amortiguadora de Tris-HCl descrita anteriormente. Extraer las quitinasas y las proteínas del tipo taumatina usando una solución amortiguadora de Tris-HCl con 100 mM de NaCl (9.1.4). Recoger todas las fracciones y desalarlas con una membrana de 10 kDa de umbral de corte (9.1.1.17), usando la solución amortiguadora de Tris-HCl 50mM, pH 8,0 (9.1.3). Pasar las fracciones proteicas desaladas por una columna de cromatografía de baja presión (9.1.1.18) que contenga una resina aniónica (9.1.1.16). Eluir con 120 mL de un gradiente de 0 a 100 mM de NaCl (9.1.5) mediante una bomba de gradiente que funcione con agua ultrapura (solución A, 9.1.1.1) y una solución de cloruro sódico 100 mM (solución B, 9.1.5). Las concentraciones de proteínas y de sal se determinan midiendo con los detectores (9.1.1.19 y 9.1.1.20) la absorbancia a 280 nm y la conductividad de los eluidos, respectivamente. Las fracciones de quitinasas y de proteínas del tipo taumatina purificadas y separadas por este procedimiento se utilizan para producir los anticuerpos.

9.3 Producción de los anticuerpos policlonales anti quitinasas y antitaumatinas en conejos

El protocolo es idéntico al descrito en el método OIV-MA-AS315-12.

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

10. Bibliografía

1. **Anónimo.** 2004. "Determinación de materias proteicas de origen vegetal en los vinos y en los mostos", OIV, *Resolución Oeno 24/2004*. 1-7 (método OIV-MA-AS315-12).
2. **Derckel, J. P.; J. C. Audran; B. Haye; B. Lambert y L. Legendre.** 1998. "Characterization, Induction by Wounding and Salicylic Acid, and Activity against *Botrytis cinerea* of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases of Ripening Grape Berries". *Physiologia Plantarum*, 104(1), 56-64.
3. **Manteau, S.; B. Lambert; P. Jeandet y L. Legendre.** 2003. "Changes in Chitinase and Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries During the Champagne Winemaking Process". *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 267-72.
4. **Manteau, S. y P. Poinssaut.** 2010. "Instabilité Protéique Des Vins Blancs Et Rosés. Partie 2/2: Comparaison Des Tests De Stabilité Protéique Dans Les Vins Blancs Et Rosés Et Mise Au Point D'un Nouveau Test: L'immunoTest™". *Revue des Œnologues*, 135, 23-27.
5. **Manteau, S.; F.-X. Sauvage; P. Poinssaut; B. Scotti; N. Sieczkowski y M. Moutounet.** 2006. "Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze", P. Jeandet, C. Clement and A. Conreux, *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine*. Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. y E. Peynaud.** 1961. "Précipitation Des Protéines", *Traité D'oenologie. Tome II - Composition, Transformations Et Traitements Des Vins*. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 346-356.
7. **Waters, E.; Y. Hayasaka; D. Tattersall; K. Adams y P. Williams.** 1998. "Sequence Analysis of Grape (*Vitis vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4950-57.

Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND