



RISOLUZIONE OIV-OENO 529-2017

IDENTIFICAZIONE DELLA CHITINASI E DELLE PROTEINE TAUMATINA-SIMILI NEI VINI BIANCHI

L'ASSEMBLEA GENERALE,

Visto l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

Su proposta della Sottocommissione "Metodi di analisi",

DECIDE di completare la *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* con il seguente metodo:

IDENTIFICAZIONE DELLA CHITINASI E DELLE PROTEINE TAUMATINA-SIMILI NEI VINI BIANCHI (metodo di tipo IV)

1. Introduzione

Per mettere in evidenza le proteine instabili e i rischi di casse proteica nei vini bianchi, numerose analisi si basano sul calore o sulla precipitazione con un agente chimico. Tali analisi conducono a risultati molto diversi, poco affidabili e persino contraddittori. Questo metodo immunologico semi-quantitativo di immunoprinting consente di ottenere un risultato in termini di presenza o assenza delle proteine instabili nei vini. Consente di individuare la chitinasi e le proteine taumatina-simili partendo da una concentrazione complessiva di 1 mg/L nei vini. Tale valore deriva da un confronto dei risultati con il metodo che si avvale dell'elettroforesi su SDS, descritto nella *Raccolta dei metodi di analisi* (OIV-MA-AS315-12), il cui limite di rivelabilità è 1 mg/L.

2. Scopo e campo di applicazione

Questo metodo immunologico di immunoprinting si applica ai vini bianchi.

3. Principio

Il metodo immunologico di immunoprinting si svolge in 3 fasi:

3.1 Deposito del campione di vino su una membrana di nitrocellulosa

3.2 Rilevazione delle proteine instabili

3.3 Rilevazione della presenza delle proteine instabili

L'intensità delle macchie (spot) colorate che si osservano sulla membrana è proporzionale alla quantità di proteine instabili e al rischio di casse proteica del vino.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

4. Reattivi e prodotti

4.1 Elenco dei reattivi e dei prodotti

Salvo indicazioni contrarie, i prodotti sono utilizzati così come vengono commercializzati.

- 4.1.1 Acqua ultrapura: resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25 °C
- 4.1.2 Un vino con un alto contenuto proteico e un vino non contenente proteine a seguito di un trattamento con bentonite. Questi vini sono utilizzati rispettivamente come campione di controllo positivo e negativo: la verifica e la quantificazione delle proteine presenti in questi vini possono essere eseguite mediante elettroforesi SDS-PAGE (Metodo OIV-MA-AS315-12)
- 4.1.3 Anticorpi policlonali di coniglio diretti contro le proteine instabili del vino: vedere il protocollo in allegato
- 4.1.4 Anticorpi policlonali di capra diretti contro gli anticorpi IgA di coniglio coniugati con perossidasi di rafano (indicati in seguito come: anticorpi Goat-anti-Rabbit-HRP)
- 4.1.5 Cloruro di sodio anidro (NaCl): n. CAS 7647-14-5
- 4.1.6 TRIS-HCl anidro: n. CAS 1185-53-1
- 4.1.7 HCl concentrato in soluzione; purezza $\geq 36,5\%$: n. CAS 7647-01-0
- 4.1.8 Tween 20: n. CAS 9005-64-5
- 4.1.9 Sieroalbumina bovina (BSA) in polvere liofilizzata; purezza $\geq 96\%$: n. CAS 9048-46-8
- 4.1.10 4-cloro-1-naftolo; purezza $\geq 99\%$: n. CAS 604-44-4
- 4.1.11 Metanolo; purezza $\geq 99,8\%$: n. CAS 67-56-1
- 4.1.12 Acqua ossigenata in soluzione (H_2O_2); purezza $\geq 30\%$: n. CAS 7722-84-1

4.2 Preparazione delle soluzioni di lavoro

Tutte le soluzioni possono essere conservate per 1 anno a 4 °C.

4.2.1 Tampone TBS (Tris-Buffered Saline)

Disciogliere 29,22 g di cloruro di sodio (4.1.5) e 2,42 g di TRIS-HCl anidro (4.1.6) in 1 litro di acqua ultrapura (4.1.1). Aggiustare il pH a 7,5 con una soluzione di HCl concentrato (4.1.7).

4.2.2 Tampone TBS-Tween 20

Nel tampone TBS (4.2.1) aggiungere 0,05% di Tween-20 (4.1.8).

4.2.3 Soluzione di arresto

Nel tampone TBS (4.2.1), aggiungere 4% di BSA (4.1.9).

4.2.4 Soluzione di anticorpi policlonali (disponibili in commercio in base a quanto descritto nel protocollo in allegato)

- 4.2.4.1 Diluire gli anticorpi policlonali anti-proteine instabili (primari) in un tampone di TBS (4.2.1), secondo le raccomandazioni commerciali o secondo i loro titoli.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

4.2.4.2 Diluire gli anticorpi policlonali Goat anti-Rabbit-HRP (secondari) in un tampone di TBS (4.2.1), secondo le raccomandazioni commerciali o secondo i loro titoli.

4.2.5 Soluzioni per la rivelazione delle proteine instabili

4.2.5.1 Disciogliere 30 mg di 4-cloro-1-naftolo (4.1.10) in 10 mL di metanolo (4.1.11). Porre la soluzione a -20 °C al riparo dalla luce fino all'uso.

4.2.5.2 Mettere 30 µL di H₂O₂ (4.1.12) al 30% in 50 mL di TBS (4.2.1) subito prima dell'uso.

5. Materiali

5.1 Elenco dei materiali e necessari per la reazione di immunoprinting

- 5.1.1 Membrana di nitrocellulosa con pori da 0,2 µm per eseguire l'immunoprinting
- 5.1.2 Pipette automatiche da 0,5 µL a 10 µL e da 100 µL a 1000 µL con puntali corrispondenti
- 5.1.3 Tubi e portatubi per le diluizioni degli anticorpi
- 5.1.4 Provette graduate di classe A
- 5.1.5 Carta assorbente
- 5.1.6 Pinza a morsetto
- 5.1.7 Vetreria da laboratorio per eseguire la reazione: piccolo cristallizzatore, piastra Petri, tubi, tappi, ecc.
- 5.1.8 Agitatore magnetico con piastra (per reazione nella piastra) o rotativo (per reazione nel tubo) con una velocità massima pari a 20 giri/min

5.2 Materiali necessari per preparare le soluzioni

- 5.2.1 Matracci graduati di classe A
- 5.2.2 pH-metro
- 5.2.3 Bilancia analitica di precisione 0,1 mg
- 5.2.4 Centrifuga da 3000 g e tubi per centrifuga

6. Campionamento

I campioni devono essere prelevati e conservati a 4 °C per non modificare le proteine naturalmente presenti nei vini.

6.1 Preparazione del campione

I campioni (o campioni di laboratorio) di vino sono depositi direttamente sulla membrana di nitrocellulosa (5.1.1) con l'aiuto della pipetta (5.1.2), senza alcuna previa preparazione.

7. Procedimento

L'analisi può essere realizzata su vini non filtrati, alla sola condizione che tali vini non contengano bentonite in sospensione, caso in cui è necessario eseguire una centrifugazione a 3000 g (5.2.4) per 10 minuti a temperatura ambiente.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Come indicato al punto 3, il metodo immunologico di immunoprinting si svolge in tre fasi e le reazioni hanno luogo a una temperatura ambiente compresa tra 18 °C e 25 °C.

7.1 Deposito del campione di vino

Deporre 5 µL (5.1.2) di aliquota dei campioni e delle soluzioni di riferimento sulla membrana di nitrocellulosa (5.1.1).

Lasciare asciugare 15-20 min a temperatura ambiente.

7.2 Aggiunta degli anticorpi monoclonali

7.2.1 Mettere la membrana nella piastra o nel tubo (5.1.7). Il volume delle soluzioni dipenderà dal contenitore e della dimensione della membrana, che deve essere ricoperta.

I volumi seguenti sono per un contenitore del tipo piastra Petri (5.1.7) piccola.

Aggiungere la soluzione di arresto (4.2.3). Agitare per almeno 30 minuti (5.1.8).

7.2.2 Il lavaggio si effettua come segue: eliminare la soluzione bloccando la membrana, se necessario, con una pinza. Aggiungere 20 mL di TBS (4.2.1), agitare per qualche minuto (5.1.8).

Lavare una seconda volta come descritto sopra ed eliminare la soluzione.

7.2.3 Aggiungere 20 mL di soluzione di anticorpi primari (4.2.4.1).

Agitare per un'ora (5.1.8).

Lavare tre volte con la soluzione di TBS-Tween 20 (4.2.2).

7.2.4 Aggiungere 20 mL di soluzione di anticorpi secondari Goat anti-Rabbit-HRP (4.2.4.2).

Agitare per un'ora.

7.2.5 Lavare con la soluzione di TBS-Tween 20 (4.2.2), come sopra, per 5 min.

Lavare due volte per 15 min con la soluzione di TBS (4.2.1) come descritto sopra.

Eliminare la soluzione.

7.3 Rilevazione della presenza delle proteine instabili

7.3.1 Miscelare le due soluzioni affinché le proteine instabili (4.2.5.1 e 4.2.5.2) possano essere visibili e mettere a contatto con la membrana (5.1.1) imbevuta con il deposito di vino e preparata secondo il protocollo 7.1 e 7.2. Agitare.

Un precipitato di colore da nero-viola fino al viola chiaro compare sulla membrana nel punto in cui sono presenti le proteine instabili.

L'intensità della colorazione dipende dalla concentrazione di proteine instabili e dunque dal rischio di casse proteica.

Dopo 20-30 min, quando la macchia corrispondente al deposito della soluzione di riferimento positiva (4.1.2) è molto intensa, interrompere la colorazione mediante lavaggio della membrana di nitrocellulosa (5.1.1) in acqua.

Mettere la membrana ad asciugare tra due fogli di carta assorbente (5.1.5).

I risultati possono essere interpretati quando la membrana è asciutta.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

8. Risultati

Affinché i risultati della reazione siano interpretabili:

- il luogo del deposito della soluzione di riferimento colorimetrico positivo deve presentare una macchia di intensità molto elevata (viola scuro-nero),
- il luogo del deposito della soluzione di riferimento colorimetrico negativo non deve presentare alcuna macchia,
- il rumore di fondo (luogo della membrana in cui non è stato effettuato nessun deposito di campione) deve essere molto chiaro, anche bianco.

È possibile ottenere un risultato semi-quantitativo tracciando una curva di calibrazione a partire da una serie di diluizioni di un vino naturalmente ricco di proteine. Tale curva di calibrazione sarà funzione delle superfici ottenute per integrazione dell'intensità delle macchie corrispondenti alla formazione degli immuno-complessi. L'analisi può essere effettuata con la stessa apparecchiatura utilizzata per analizzare i gel di elettroforesi descritti nel Metodo OIV-MA-AS315-12.

L'interpretazione dei risultati può essere condotta anche visivamente.

8.1 Per eseguire un controllo diretto sul vino della presenza o assenza di proteine instabili

Vi è presenza di proteine nel campione di laboratorio se l'intensità della macchia ottenuta è maggiore dell'intensità della macchia della soluzione di riferimento negativo.

L'intensità della macchia ottenuta dopo la reazione è proporzionale alla quantità di proteine instabili e, quindi, proporzionale al rischio di casse proteica nel vino.

8.2 Per verificare l'assenza di proteine dopo un trattamento (specialmente con bentonite)

Vi è presenza di proteine nel campione se l'intensità della macchia ottenuta dalla prova senza trattamento con bentonite è maggiore dell'intensità della macchia della soluzione di riferimento colorimetrico negativo.

Nel caso dell'applicazione di una "gamma di prodotti per il trattamento (bentonite)" in prove di laboratorio, l'intensità delle macchie di ogni prova deve diminuire parallelamente all'aumento della concentrazione del prodotto per il trattamento. Quando per una macchia questa intensità è nulla o minima ma costante rispetto ad altri punti della gamma, sarà applicata la dose del prodotto per il trattamento corrispondente a questa macchia per ottenere la stabilità proteica del vino analizzato.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

9. Allegati

Produzione degli anticorpi policlonali diretti contro le proteine instabili

Gli anticorpi diretti contro le proteine instabili dei vini bianchi e rosati possono essere preparati nei conigli. È la loro specificità che rende il metodo affidabile e preciso.

9.1 Realizzazione della purificazione della chitinasi e delle proteine taumatina-simili

9.1.1 Elenco dei prodotti e dei materiali

- 9.1.1.1 Acqua ultra pura: resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 9.1.1.2 Uva da vino raccolta a maturazione tecnologica (vitigno Chardonnay o Sauvignon blanc ad esempio)
- 9.1.1.3 Acetato di sodio anidro: n. CAS 127-09-3
- 9.1.1.4 Triton-X-100: n. CAS 9002-93-1
- 9.1.1.5 Solfato d'ammonio anidro: n. CAS 127-09-3
- 9.1.1.6 Cloruro di sodio anidro (NaCl): n. CAS 7647-14-5
- 9.1.1.7 TRIS-HCl anidro: n. CAS 1185-53-1
- 9.1.1.8 Acido cloridrico al 37%: n. CAS 7647-01-0
- 9.1.1.9 Soluzione di idrossido di sodio NaOH: n. CAS 1310-73-2
- 9.1.1.10 Vetreria da laboratorio compresi matracci graduati e pipette di classe A
- 9.1.1.11 Pinze a morsetto
- 9.1.1.12 Centrifuga a 10.000 g
- 9.1.1.13 Bilancia analitica con precisione 0,1 mg
- 9.1.1.14 pH-metro
- 9.1.1.15 Resina anionica forte
- 9.1.1.16 Resina anionica
- 9.1.1.17 Membrana con soglia di taglio di 10 kDa
- 9.1.1.18 Apparecchiatura per cromatografia liquida a bassa pressione con pompa a gradiente di concentrazione
- 9.1.1.19 Rivelatore per la misurazione dell'assorbanza a 280 nm
- 9.1.1.20 Rivelatore conduttimetrico

9.1.2. Preparazione del tampone di acetato di sodio (9.1.1.3) diluito fino a concentrazione di 50 mM, 0,25% di Triton-X-100 (9.1.1.4) a pH 5

In un matraccio graduato da 1 L (9.1.1.10) porre in successione:

- 4,1 g di acetato di sodio (9.1.1.3),
- 2,5 g di Triton-X-100 (9.1.1.4).

Portare a volume di 1 L con acqua ultra pura (9.1.1.1) e agitare. Utilizzando HCl al 37% (9.1.1.8) aggiustare il pH fino a 5. Questo per evitare che la soluzione abbia un pH basico che potrebbe avere delle ripercussioni negative sulle proteine da estrarre o impedirne l'estrazione.

9.1.3 Preparazione del tampone TRIS-HCl 50 mM a pH 8,0

In un matraccio graduato da 1 L (9.1.1.10) porre:

- 7,9 g di TRIS-HCl anidro (9.1.1.7).

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Portare a volume di 1 L con acqua ultra pura (9.1.1.1). Utilizzando una soluzione di NaOH 1M (9.1.1.9) aggiustare il pH fino a 8.

9.1.4 Preparazione del tampone TRIS-HCl 50 mM, 100 mM di NaCl

In un matraccio graduato da 1 L (9.1.1.10) porre in successione:

- 7,9 g di TRIS-HCl anidro (9.1.1.7),
- 5,8 g di cloruro di sodio anidro (9.1.1.6).

Portare a volume di 1 L con acqua ultra pura (9.1.1.1) e agitare.

9.1.5 Preparazione della soluzione di cloruro di sodio 100 mM

In un matraccio graduato da 1L (9.1.1.10) porre in successione :

- 5,8 g di cloruro di sodio anidro (9.1.1.6).

Portare a volume di 1 L con acqua ultra pura (9.1.1.1) e agitare.

9.2 Procedimento

Uve di vitigno Pinot nero o Chardonnay sono raccolte a maturazione e congelate a -20 °C. I semi sono eliminati dagli acini congelati prima della frantumazione. 3 g di acini senza semi sono frantumati in 10 mL di tampone acetato di sodio (9.1.2) diluito fino a concentrazione di 50 mM, pH 5, contenente 0,25% di Triton X-100 (9.1.1.4).

Il materiale insolubile è eliminato per centrifugazione (5 min a 3000 g) (9.1.1.12). Il surnatante (2 mL) è allora congelato a -20 °C durante la notte ai fini della chiarificazione. L'estratto è allora centrifugato a 10.000 giri per 15 min per eliminare il materiale insolubile.

Viene aggiunto solfato di ammonio (9.1.1.5) al surnatante fino al raggiungimento di una concentrazione del 30%. La miscela è agitata per 1 ora a 4 °C e poi di nuovo centrifugata come descritto sopra.

Viene aggiunto nuovamente solfato di ammonio (9.1.1.5) al surnatante fino al raggiungimento di una concentrazione finale del 60%. La miscela è agitata per 2 ore a 4 °C e poi di nuovo centrifugata come descritto sopra.

Il precipitato proteico viene raccolto e quindi ridissolto in 1 mL di tampone Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Le proteine sono fissate su una colonna contenente una resina anionica forte (5 x 30 cm) (9.1.1.15). La colonna è lavata con il tampone Tris-HCl descritto sopra. Con un tampone Tris-HCl contenente 100 mM di NaCl, si estraggono quindi la chitinasi e le proteine taumatina-simili. Tutte le frazioni vengono raccolte, poi dissalate su una membrana con soglia di taglio di 10 kDa (9.1.1.17) con il tampone Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.4.3). Le frazioni proteiche dissalate vengono passate su una colonna cromatografica a bassa pressione (9.1.1.18) contenente una resina anionica (9.1.1.16). L'eluizione è realizzata con 120 mL di un gradiente di NaCl (9.1.15) variabile da 0 a 100 mM mediante una pompa a gradiente di concentrazione e utilizzando una soluzione A di acqua ultra pura (9.1.1.1) e una soluzione B di cloruro di sodio a 100 mM (9.1.5). Le concentrazioni di proteine e di sale sono determinate rispettivamente misurando l'assorbanza a 280 nm e la conducibilità dei fluidi in uscita della colonna utilizzando i rivelatori (9.1.1.19 e 9.1.1.20). Le frazioni proteiche di chitinasi e di proteine taumatina-simili così purificate e separate sono utilizzate per la produzione degli anticorpi.

9.3 Produzione degli anticorpi policlonali anti-chitinasi e taumatina-simili nel coniglio

Il protocollo è identico a quello descritto nel Metodo OIV-MA-AS315-12.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

10. Bibliografia

1. **Anonimo.** 2004. "Ricerca di sostanze proteiche di origine vegetale nei vini e nei mosti," OIV, Risoluzione Oeno 24/2004. 1-7 (Metodo OIV-MA-AS315-12).
2. **Derckel, J. P.; J. C. Audran; B. Haye; B. Lambert e 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 e 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. e P. Poinsaut.** 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. Poinsaut; B. Scotti; N. Sieczkowski e M. Moutounet.** 2006. *Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze, P. Jeandet, C. Clement e A. Conreux, Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine.* Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. e 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 e 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.

Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Jean-Marie AURAND