RESOLUTION OIV-OENO 573-2018

BESTIMMUNG DER HEMICELLULASE-AKTIVITÄT IN ENZYMPRÄPARATEN

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

gestützt auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation von Rebe und Wein,

auf Vorschlag der Sachverständigengruppe „Spezifikationen önologischer Erzeugnisse“,

BESCHLIESST, Kapitel 1 des internationalen önologischen Kodex durch die Spezifikation COEI-1-XYLANA zu ergänzen:

Bestimmung der Endo-1,4-β-Xylanase-Aktivität in enzympräparaten

(EC 3.2.1.8, CAS-Nr. 9025-57-4)

Allgemeine Spezifikationen

Hemicellulasen sind in der Regel neben anderen Enzymen in Enzympräparaten vorhanden. Sofern nicht anders angegeben, müssen die Spezifikationen der Resolution OENO 365-2009 „allgemeine Spezifikationen von Enzympräparaten“ entsprechen, die im internationalen önologischen Kodex angeführt sind.

1. Ursprung und Anwendung

Hemicellulasen katalysieren den Abbau von Hemicellulosen.

Hemicellulasen der Zellwände von Trauben bestehen hauptsächlich aus Xyloglucanen und Arabinoxylanen; diese beiden Polysaccharide machen fast 90 % der Hemicellulasen der Traube aus.

Die Hemicellulase-Aktivität von Enzympräparaten wird durch Messung der 1,4-beta-Xylanase-Aktivität bewertet. Enzympräparate mit Hemicellulase-Aktivität werden bei der Traubenmazeration, der Klärung von Mosten und Weinen und zur Verbesserung der Filtrierbarkeit eingesetzt.

Enzympräparate mit diesen Enzymaktivitäten werden durch gesteuerte Fermentation von z.B. Aspergillus niger sp. oder Trichoderma sp. oder aus Gemischen der so

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

erhaltenen Enzyme gewonnen.

2. Anwendungsbereich

Die Bestimmungsmethode wurde unter Verwendung handelsüblicher Xylanase erstellt. Die Bedingungen wurden für die Anwendung handelsüblicher Enzympräparate festgelegt, die in der Kellerwirtschaft eingesetzt werden.

3. Prinzip

Xylanasen hydrolysieren Xylan-Ketten und setzen somit die reduzierenden Enden der Zuckerbestandteile frei. Die Bestimmung der Xylanase-Aktivität erfolgt nach der Methode nach Nelson (1944) anhand der Messung der reduzierenden Zucker (Xylose), die während der Inkubation freigesetzt werden. In alkalischem Milieu reduziert die Pseudoaldehydgruppe der Zucker die Kupferionen Cu2+. Diese reagieren mit Arsenmolybdat und verursachen eine Blaufärbung, deren Extinktion, gemessen bei 520 nm, linear mit der Zuckerkonzentration (zwischen 0 und 400 ¤g/mL) korreliert.

4. Geräte

4.1. Magnetrührer mit Heizung

4.2. Wasserbad, 40 °C

4.3. Wasserbad, 100 °C

4.4. Becherglas, 100 mL

4.5. Zentrifuge für 15 mL-Zentrifugenröhrchen

4.6. Laborwecker

4.7. Messkolben, 100 mL

4.7.1. Messkolben, 500 mL

4.8. Präzisionsspritze, 200 µL

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

4.8.1. Präzisionsspritze, 1 mL

4.9. 10 mL-Pipette mit 1/10 mL Gradeinteilung

4.10. Spektrophotometer

4.11. Zentrifugenröhrchen, 15 mL

4.12. Vortex-Schüttler

4.13. 500 mL-Glaskolben, Braunglas

4.14. Kühlkammer, 4 °C

4.15. Wärmeschrank, 37 °C

4.16. gereinigte Baumwolle

4.17. Krepppapier

4.18. pH-Meter

4.19. Reagenzglasständer für 15 mL-Zentrifugenröhrchen

4.20. Einwegküvetten, Schichtdicke 1 cm für Spektrophotometer für Messungen im sichtbaren Bereich

5. Reagenzien

5.1. Natriumacetat (CH_3COONa, Reinheit 99 % - MG = 82g/mol)

5.2. Essigsäure (CH_3COOH, Reinheit 96 % - MG = 60 g/mol, Dichte = 1,058)

5.3. Xylan (Beechwood) P-XYLNBE-10G, Charge 171004a Megazyme

© OIV 2018

5.4. Wasserfreies Natriumsulfat (Na_2SO_4, Reinheit 99, 5% - MG = 142 g/mol)

5.5. Wasserfreies Natriumcarbonat (Na_2CO_3, Reinheit 99,5 % - MG = 105,99 g/mol)

5.6. Kalium- und Natriumtartrat ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$, Reinheit 99 % - MG = 282,2 g/mol)

5.7. wasserfreies Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$, Reinheit 98 % - MG = 84,01 g/mol)

5.8. Kupfersulfat-Penta-Hydrat ($CuSO_{45}H_20$, Reinheit 99 % - MG = 249,68 g/mol)

5.9. konzentrierte Schwefelsäure (H_2SO_4, Reinheit 98 %)

5.10. Ammoniumheptamolybdat ($(NH_4)\ 6MO_7O_{24}.4H_2O$, Reinheit 99 % - MG = 1235,86 g/mol)

5.11. Natriumhydrogenarsenat ($Na_2HasO_4.7H_2O$, Reinheit 98,5 % - MG = 312,02 g/mol)

5.12. D-Xylose ($C_5H_{10}O_5$, Reinheit 99% - MG = 150 g/mol)

5.13. destilliertes Wasser

5.14. handelsübliches Enzympräparat

6. Lösungen

6.1. Reagenzien der oxidierenden Lösung

Diese Reagenzien müssen aufgrund der 24-stündigen Wartezeit bei der Lösung D zuerst hergestellt werden.

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

6.1.1. Lösung A: nacheinander in ein 100 mL-Becherglas (4.4) geben:

- 20 g wasserfreies Natriumsulfat (5.4)
- 2,5 g wasserfreies Natriumcarbonat (5.5)
- 2,5 g Kalium- und Natriumtartrat (5.6)
- 2 g wasserfreies Natriumhydrogencarbonat (5.7)

In 80 mL destilliertem Wasser lösen (5.13). Bis Zur Auflösung erhitzen und rühren (4.1) und in einen 100 mL-Messkolben (4.7) überführen. Mit destilliertem Wasser (5.13) zur Marke auffüllen.

Bei 37 °C aufbewahren (4.15), bei Ablagerungen durch ein Faltenfilter filtrieren.

6.1.2. Lösung B:

15 g Kupfersulfat-Penta-Hydrat (5.8) in 100 mL destilliertem Wasser (5.13) lösen und einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure (5.9) zugeben.

6.1.3. Lösung C:

Diese Lösung ist frisch herzustellen, um das richtige Verhältnis zwischen Farbdichte und Glucosemenge zu erzielen; hierzu werden 1 mL der Lösung B (6.1.2) und 24 mL der Lösung A (6.1.1) gemischt.

6.1.4. Lösung D:

25 g Ammoniumheptamolybdat (5.10) in einem 500-mL-Messkolben (4.7.1) in 400 mL Wasser (5.13) lösen. 25 mL konzentrierte Schwefelsäure (5.9) zugeben (unter kaltem Wasserstrahl abgekühlt).

In einem 100 mL-Becherglas (4.4) 3 g Natriumhydrogenarsenat (5.11) in 25 mL destilliertem Wasser (5.13) lösen und in einen 500 mL-Messkolben überführen (4.7.1), der Ammoniumheptamolybdat (5.10) enthält. Mit destilliertem Wasser (5.13) zur Marke auffüllen.

24 Stunden bei 37 °C (4.15), dann in einem 500 mL-Glaskolben (4.13) bei 4° C (4.14) aufbewahren.

6.2. Natriumacetat-Puffer (pH 4,2, 100 mmol/L)

Er enthält die Lösungen A und B.

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

6.2.1. Lösung A: 0,1 M Natriumacetat: 0,5 g Natriumacetat (5.1) in 60 mL destilliertem Wasser lösen (5.13)

6.2.2. Lösung B: 0,1 M Essigsäure: 1 mL Essigsäure (5.2) mit 175 mL destilliertem Wasser (5.13) auffüllen

6.2.3. Herstellung des Natriumacetat-Puffers: 23,9 mL der Lösung A (6.2.1) + 76,1 mL der Lösung B (6.2.2) mischen,

den pH-Wert des Puffers anhand eines pH-Meters (4.18) überprüfen,

die Lösung bei 4 °C (4.14) aufbewahren.

6.3. Haferxylan-Lösung, 2 % (Gew./Vol.)

In einem 100 mL-Messkolben (4.7) 1 g Haferxylan (5.3) in 100 mL Natriumacetat-Puffer (6.2) lösen

6.4. Xylose-Stammlösung, 400µg/mL

0,040 g D-Xylose (5.12) in 100 mL destilliertem Wasser (5.13) lösen

7. Herstellung der Xylose-Standardreihe

Die Herstellung der Standardreihe anhand der Xylose-Stammlösung (0 - 400 µg/mL) (6.4) erfolgt wie in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Xylose-Standardreihe

Xylose (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Xylose (µmol/mL)	0	0.232	0.462	0.694	0.925	1.156	1.387	1.890
Vol. Stammlösung (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Vol. destilliertes Wasser (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

8. Vorbereitung der Probe

Vor der Probenahme muss das Enzympräparat zum Beispiel durch Umschwenken des Gefäßes homogenisiert werden. Die Enzymlösung und die Blindproben sind unmittelbar vor der Anwendung herzustellen.

8.1. Enzymlösung, 2 g/L

200 mg Enzympräparat (5.14) in einen 100 mL Messkolben (4.7) geben und mit destilliertem Wasser (5.13) zur Marke auffüllen; schütteln, um eine homogene Mischung zu erhalten.

8.2. Denaturierung der Blindprobe durch Erhitzen

10 mL Enzymlösung, 2 g/l (8.1) in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen (4.11) geben, das Röhrchen mit gereinigter Baumwolle (4.1.6) und Krepppapier (4.1.7) verschließen und 5 min im Wasserbad (4.3) erhitzen (100 °C).

9. Durchführung

9.1. Enzymatische Reaktion: Es ist zumindest eine Doppelbestimmung durchzuführen.

In fünf 15 mL-Röhrchen (4.11), die im Reagenzglasständer (4.19) von 1 bis 5 nummeriert sind, zugeben:

200 µL Enzymlösung, 2 g/l (8.1) mit Hilfe einer Präzisionspipette, 200 µL (4.8),

400 µL Natriumacetat-Puffer (6.2) mit Hilfe einer Präzisionspipette, 1 mL (4.8.1) und

600 µL Haferxylan, 2 % (6.3), Laborwecker (4.6) einschalten

Schütteln (4.12) und die mit gereinigter Baumwolle (4.16) und Krepppapier (4.17) verschlossenen Röhrchen in ein Wasserbad (40 °C) (4.2) stellen:

- Röhrchen Nr. 1: eine Minute
- Röhrchen Nr. 2: 2 Minuten
- Röhrchen Nr. 3: 5Minuten
- Röhrchen Nr. 4: 10 Minuten
- Röhrchen Nr. 5: 20 Minuten

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

Die Reaktion wird gestoppt, indem die von 1 bis 5 nummerierten Röhrchen aus dem Wasserbad (40 °C) genommen und unverzüglich 10 Minuten in ein Wasserbad (100 °C) (4.3) gestellt werden.

Die Röhrchen werden unter einem kalten Wasserstrahl abgekühlt.

9.2. Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Verbindunghen (in diesem Fall Xylose)

In ein 15 mL-Röhrchen (4.11)

1 mL des Reaktionsmediums (9.1) geben,

1 mL der Lösung C (6.1.3) zugeben,

schütteln (4.12) und das Röhrchen 10 Minuten in ein Wasserbad (100 °C) (4.3) stellen und dann unter einem kalten Wasserstrahl abkühlen.

1 mL der Lösung D (6.1.4) zugeben,

9,5 mL Wasser (5.14) mit Hilfe der 10 mL-Pipette (4.9) zugeben,

bis zur Farbstabilisierung 10 Minuten warten,

alle Zentrifungenröhrchen 10 Minuten bei 5000 UpM zentrifugieren (4.5),

den Überstand in eine Küvette (4.20) geben,

mit einem Spektrophotometer sofort die Extinktion bei 520 nm messen.

9.3. Blindproben

Wie in Ziffer 9.1 beschrieben vorgehen und die Enzymlösung 2 g/l (8.1) durch die denaturierte Blindprobe (8.2) ersetzen. Idealerweise sollte die enzymatische Reaktion der Blindproben gleichzeitig mit der der Enzymlösung ablaufen.

9.4. Standardreihe

Wie in Ziffer 9.2 beschrieben vorgehen und das Reaktionsmedium (9.1) durch die einzelnen Lösungen der Xylose-Standardreihe (0 - 400 µg/mL) (7) ersetzen.

10. Berechnung

10.1. Bestimmung der Kinetik

Generell kann die Enzymaktivität nur berechnet werden, wenn Substrat und Enzym nicht in begrenzten Mengen vorhanden sind. In diesem Fall befindet sich die kinetische Reaktion in der Anstiegsphase: die Enzymaktivität ist in Abhängigkeit von der Zeit linear. Im Fall zu geringer Mengen würde die Aktivität unterschätzt

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

(Abbildung 1).

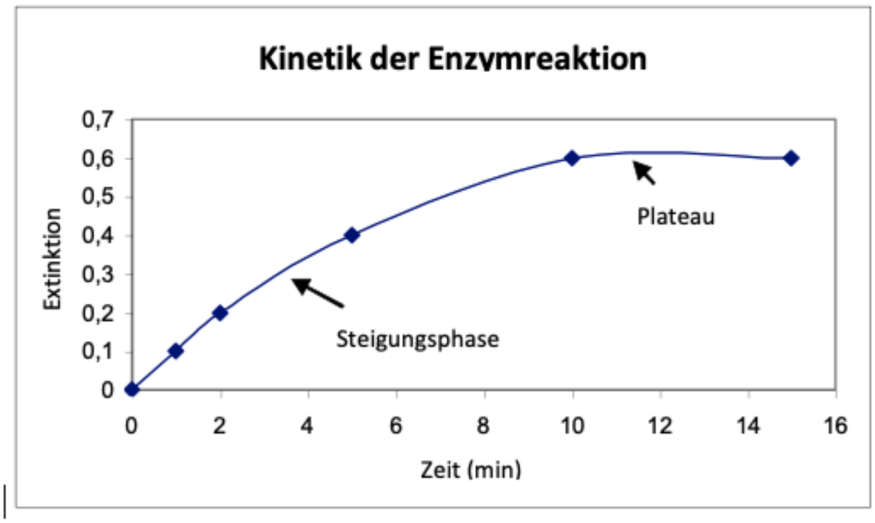


Abbildung 1: Kinetik der Enzymreaktion

Die Kinetik wird über 15 min bestimmt. Die betreffende Aktivität wird nach T=1 min T=2 min, T=5 min, T=10 min, T=15 min gemessen.

Nach der Bestimmung der Kinetik der Enzymreaktion wird die Änderung der Extinktion gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Die Extinktion entspricht der Differenz zwischen der Extinktion zu einem Zeitpunkt T des Enzympräparats und der entsprechenden Blindprobe.

Anschließend wird die Gleichung [1] der Regressionsgeraden aufgestellt. Dabei werden nur die Punkte der aufsteigenden Phase berücksichtigt (siehe Abbildung 1).

10.2. Erstellen der Kalibriergeraden

Die Kalibriergerade wird anhand einer Graphik erstellt, in der die Konzentrationen der Xylose-Standardreihe (0 - 1,89 µmol/mL) auf der Abszisse und die entsprechenden Werte der optischen Dichte (9.4) auf der Ordinate eingetragen werden. Anschließend wird die Steigung (Q/T) im linearen Bereich der Regressionsgeraden (2) berechnet.

10.3. Berechnung der Enzymaktivität

Anhand der Regressionsgeraden (1) wird die Extinktion für eine mittlere Reaktionszeit T (z.B. 4 min wie in Abbildung 1) zur Berechnung der in diesem Zeitraum freigesetzten Menge an Xylose (Q) anhand der Gleichung (2) harangezogen.

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

Die Enzymaktivität in U/g Präparat wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$Aktivität\ in\ U/g\ = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

- Q: Menge an Xylose in µmol, die in einem Zeitraum T (min) freigesetzt wird
- V: Menge der zugesetzten Enzymlösung (mL), hier 0,2 mL
- C: Konzentration der Enzymlösung (g/l), hier 2 g/l

Katalytische Aktivität in Nanokatal:
Aktivität in nkat/g = (Aktivität in U/g) x (1000/60)

$$Aktivität\ in\ nkat/g = (aktivität\ in\ U/g) \times (1000/60)$$

Diese Einheit entspricht der Zahl der pro Sekunde freigesetzten Nanomole.

11. Eigenschaften der Methode

- r= 0,056
- R= 0,056
- Sr= 0,02
- SR= 0,02

Die Wiederholbarkeit der Methode wird anhand der Standardabweichungen des Mittelwerts der Extinktionen einer Probe des Enzympräparats ermittelt (5-fach Bestimmung). Für die Bestimmung von Xylanase beträgt die Standardabweichung des Mittelwerts 0,02 und der Variationskoeffizient 9,7 %. Der Variationskoeffizient entspricht:

$$\frac{(Mittelwert\ der\ Standardabweichungen\ \times 100)}{Mittelwert\ der\ Testwerte}$$

Die dargestellte Methode wird somit als wiederholbar eingestuft.

Beglaubigte Ausführung Punta del Este, 23. November 2018
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

Die Bestimmung der Vergleichbarkeit erfolgte anhand von 2 Enzympräparaten (5-fach-Bestimmung).
Die Vergleichbarkeit der Methode wurde anhand von 2 Tests nachgewiesen:

- Varianzanalyse (Untersuchung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Abweichungen bei der Probenahme). Die Varianzanalyse ist eine statistische Methode, mit der die Hypothese der Homogenität von k Mittelwerten untersucht werden kann. Anhand der Varianzanalyse wird geprüft, ob die Wirkung der „Behandlung signifikant ist oder nicht".
- Die Terststärke in Bezug auf das □-Risiko erster Art (5%): Das □-Risiko erster Art ist das Risiko zu entscheiden, dass tatsächlich gleiche Behandlungen unterschiedlich sind.

Eine schwache Teststärke (≅ 20 %) bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den Behandlungen festgestellt wurde; bestünde tatsächlich ein Unterschied, ist die Wahrscheinlichkeit des Eintritts gering.
Eine hohe Teststärke (≅ 80 %) bedeutet, dass kein Unterschied festgestellt wurde; bestünde tatsächlich ein Unterschied, wäre es möglich gewesen, diesen festzustellen.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angeführt.

Bestimmung	**Hypothesen der Varianzanalyse**	**Wahrschein-lichkeit**	**Teststärke (α = 5%)**	**Test nach Newman-Keuls (*)**	**Test nach Bonferroni (**)**
Xylanase	Entsprechend	0.00087	93%	Signifikant	Signifikant

Tabelle 2: Varianzanalyse – Untersuchung der Wirkung der Probenahme

* Newman-Keuls-Test: anhand dieses Tests können durch den Vergleich der Mittelwerte homogene Behandlungsgruppen gebildet werden: Mitglieder der gleichen Gruppe werden in Bezug auf das gewählte □-Risiko der ersten Art als nicht unterschiedlich betrachtet.

** Bonferroni-Test (auch als t-Test bezeichnet): dieser Test ermöglicht paarweise Vergleiche von Mittelwerten, d.h. (t (t-1))/2 Vergleiche vor der Behandlung unter Beachtung des gewählten □-Risikos der ersten Art.

Anhand der durchgeführten Versuche kann somit festgestellt werden, ob tatsächlich ein Unterschied vorliegt (hohe Teststärke). Die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Methode Abweichungen der Aktivität (zwischen den Probenahmen) auftreten, die

© OIV 2018

durch die Zugehörigkeit zu einer gleichen Gruppe (Test nach Newman-Keuls nicht signifikant) verstärkt wird und in Bezug auf das □-Risiko der ersten Art (Test nach Bonferroni nicht signifikant) als nicht unterschiedlich betrachtet wird, liegt unter 5 %.

12. Literatur

1. NELSON N. A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose. The may Institute for medical research of the Jewish hospital, 1944. p 375-380
2. Thierry Doco, et al. « Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides, Carbohydrate Polymers, Volume 53, Issue 3, 15 August 2003, Pages 253-261).

© OIV 2018