RESOLUCIÓN OIV-OENO 625-2021

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEÁSICA (ASPERGILOPEPSINA I) DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 b) ii del Acuerdo del 3 de abril de 2001, por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

CONSIDERANDO los trabajos del Grupo de expertos “Especificación de los Productos Enológicos”,

CONSIDERANDO las Resoluciones OIV-OENO 541A-2021, “Utilización de la Aspergilopepsina I para eliminar las proteínas causantes de quiebras proteicas en el mosto”, y OIV-OENO 541B-2021, “Utilización de la Aspergilopepsina I para eliminar las proteínas causantes de quiebras proteicas en el vino”,

CONSIDERANDO que esta determinación solo es adecuada para comparar la actividad proteolítica de preparados enzimáticos

DECIDE, a propuesta de la Comisión II “Enología”, añadir la siguiente monografía al capítulo 1 del Codex Enológico Internacional:

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEÁSICA (ASPERGILOPEPSINA I) DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS

1. ORIGEN

Los preparados enzimáticos con actividad Aspergilopepsina I se obtienen mediante fermentación controlada con Aspergillus spp. y, en particular, Aspergillus niger.

Esta enzima se conoce como Aspergilopepsina I o proteasa ácida de Aspergillus (EC 3.4.23.18). Las proteasas suelen presentarse en forma de complejos enzimáticos. Salvo disposición contraria, las especificaciones de la Resolución OIV-OENO 365-2009 deben ajustarse a las especificaciones generales de preparados enzimáticos del Codex Enológico Internacional.

Véase el apartado 5, “Fuentes de enzimas y medios de fermentación”, de la monografía general sobre preparados enzimáticos.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Véase el Código Internacional de Prácticas Enológicas y las Resoluciones OIV-OENO 541A-2021 y OIV-OENO 541B-2021.

Los preparados enzimáticos con actividades proteásicas (Aspergilopepsina I) degradan las proteínas nativas del mosto o el vino, con el tratamiento térmico adecuado. Dichas proteínas generan grandes dificultades durante las etapas de clarificación y estabilización del mosto y el vino. Por ello, las proteasas se utilizan específicamente para estabilizar mostos y vinos ricos en proteínas.

Para comprobar que el tratamiento ha eliminado las proteasas (Aspergilopepsina I) y ha reducido la concentración de proteínas nativas, se pueden analizar las proteínas del vino terminado según el método de SDS-PAGE que figura en el anexo I de la presente monografía.

3. FUNDAMENTO

Este procedimiento sirve exclusivamente para determinar la actividad proteolítica, expresada en unidades espectrofotométricas de proteasa ácida (SAPU), de preparados enzimáticos obtenidos mediante, por ejemplo, Aspergillus niger y Aspergillus oryzae. El ensayo se basa en la hidrólisis enzimática de un sustrato de caseína (Hammarsten) a pH 3,0 y 37 °C durante 30 min. La adición de ácido tricloroacético provoca la precipitación del sustrato no hidrolizado, que se elimina por filtración. La cantidad de caseína solubilizada presente en el filtrado se determina por espectrofotometría (referencia: Códice de Sustancias Químicas para Alimentos).

4. REACTIVOS Y SOLUCIONES

4.1. Caseína: Utilizar caseína de grado Hammarsten (CAS 9000-71-9, p. ej.: Merck 102242).

4.2. Solución amortiguadora de glicina-ácido clorhídrico (0,05 M): Disolver 3,75 g de glicina en unos 800 mL de agua. Ajustar el pH de la solución a 3,0 con ácido clorhídrico 1 M y un pH-metro. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 1000 mL, enrasar con agua y mezclar.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

4.3. Solución de TCA: Disolver 18,0 g de ácido tricloroacético y 11,45 g de acetato de sodio anhidro en unos 800 mL de agua. Añadir 21,0 mL de ácido acético glacial. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 1000 mL, enrasar con agua y mezclar.

4.4. Solución de sustrato: Con una pipeta, añadir 8 mL de ácido clorhídrico 1 M a unos 500 mL de agua. Añadir 7,0 g (en seco) de caseína (4.1) y mezclar agitando continuamente. Calentar durante 30 min en un baño María en ebullición, removiendo de vez en cuando. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Disolver 3,75 g de glicina en la solución y ajustar el pH a 3,0 con ácido clorhídrico 0,1 M y un pH-metro. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 1000 mL, enrasar con agua y mezclar.

5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar el preparado enzimático, transferirlo cuantitativamente a un mortero de vidrio y triturar con un poco de solución amortiguadora de glicina-ácido clorhídrico (4.2).

Transferir cuantitativamente la mezcla a un matraz aforado del volumen adecuado, enrasar con solución amortiguadora de glicina-ácido clorhídrico (4.2) y mezclar.

Preparar la solución de preparado enzimático objeto del ensayo de modo que, con 2 mL de la dilución final, la absorbancia corregida medida a 275 nm (A en el procedimiento) del filtrado de la solución enzimática incubada se sitúe entre 0,200 y 0,500.

6. PROCEDIMIENTO

- Preparar una serie de tubos de ensayo de 25 mm × 150 mm, compuesta, como mínimo, por dos tubos para cada muestra, uno para cada blanco de enzima y uno para cada blanco de sustrato. Con una pipeta, poner 10,0 mL de solución de sustrato (4.4) en cada tubo.
- Tapar los tubos y estabilizar durante 15 min en un baño María a 37 °C ± 0,1 °C.
- Poner en marcha el cronómetro (instante cero) y, con una pipeta, añadir rápidamente 2,0 mL de la solución de la muestra al sustrato estabilizado.
- Mezclar moviendo los tubos suavemente y volver a colocarlos en el baño María.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

(Nota: Los tubos se deben incubar con tapón).

- Añadir al blanco de sustrato 2 mL de la solución amortiguadora de glicina-ácido clorhídrico, en lugar de la solución de la muestra.
- Pasados exactamente 30 min, añadir 10 mL de la solución de TCA (4.3) a cada solución enzimática incubada y al blanco de sustrato, para detener la reacción. (Atención: No pipetear la solución de TCA con la boca).
- Preparar un blanco de enzima con 10 mL de solución de sustrato, 10 mL de solución de TCA y 2 mL de la solución de la muestra (por este orden).
- Calentar todos los tubos en el baño María durante 30 min, de modo que la proteína precipitada se coagule completamente.
- Al final del segundo calentamiento, enfriar los tubos en un baño de hielo durante 5 min y filtrar con papel de filtro Whatman n.o 42 o equivalente. Los filtrados deben ser totalmente transparentes.
- En un espectrofotómetro adecuado y con una cubeta de 1 cm, medir la absorbancia de cada filtrado a 275 nm frente al blanco de sustrato. Corregir las absorbancias restando la absorbancia del blanco de enzima correspondiente.

6.1. Curva de calibración

- En un matraz aforado de 1000 mL, introducir 181,2 mg de L-tirosina de grado cromatográfico o equivalente (CAS 60-18-4, p. ej.: Merck 108371), previamente desecada hasta peso constante.
- Disolver en 60 mL de ácido clorhídrico 0,1 M.
- Una vez disuelta completamente, diluir la solución enrasando con agua y mezclar bien. Esta solución contiene 1,00 μmol de tirosina por cada 1,0 mL.
- A partir de esta solución madre, preparar diluciones que contengan 0,10 µmol/mL, 0,20 μmol/mL, 0,30 μmol/mL, 0,40 μmol/mL y 0,50 μmol/mL.
- Con una cubeta de 1 cm, medir la absorbancia de cada dilución a 275 nm frente a un blanco preparado con agua.
- Representar la absorbancia frente a la concentración de tirosina en μmol/mL. Se debe obtener una línea recta.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

- Hallar la pendiente y la ordenada en el origen para los cálculos posteriores. Se debe obtener un valor cercano a 1,38 para la pendiente. Para calcular la pendiente y la ordenada en el origen se puede utilizar el método de mínimos cuadrados:

$$Pendient = \left[n\sum(MA) - \sum(M)\sum(A)\right]/\left[n\sum(M^2) - (\sum M)^2\right]$$

$$Ordenada\ en\ el\ origien = \left[\sum(A)\sum(M^2) - \sum(M)\sum(MA)\right]/\left[n\sum(M^2) - (\sum M^2\right]$$

donde n es el número de puntos de la curva de calibración, M es la concentración de tirosina (en μmol/mL) para cada uno de los puntos de la curva de calibración y A es la absorbancia de la muestra.

6.2. Cálculos

Una unidad espectrofotométrica de proteasa ácida corresponde a la actividad que libera 1 µmol de tirosina por min en las condiciones especificadas. La actividad se calcula mediante la siguiente fórmula:

SAPU/g = (A − I) × 22 / (S × 30 × W)

donde:

- **A** es la absorbancia corregida del filtrado de la solución enzimática incubada,
- **I** es la ordenada en el origen de la curva de calibración,
- **22** es el volumen final, en mL, de la mezcla de incubación,
- **S** es la pendiente de la curva de calibración,
- **30** es el tiempo de incubación, en min, y
- **W** es el peso, en g, de la muestra de enzima contenida en los 2,0 mL de la solución de la muestra que se añaden a la mezcla de incubación en el procedimiento.

Anexo I: Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

1. FUNDAMENTO

Este ensayo se basa en una versión modificada del método de Bradford (Marchal et al., 1997; Marchal et al., 1996) y la electroforesis SDS-PAGE.

Las proteínas se cuantifican por el método de Bradford con ultrafiltración a 3 kDa, para reducir las interferencias debidas al etanol y los compuestos fenólicos (Marchal y otros, 1996), y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), para separar las proteínas en función de su masa molecular (Laemmli, 1970).

2. PROCEDIMIENTO

Someter las muestras (vinos antes del tratamiento, vinos a los que se acaba de añadir Aspergilopepsina I y vinos después del tratamiento) a ultrafiltración con filtros de centrífuga de 3 kDa (p. ej.: Amicon® Ultra-4, Merck Millipore, Irlanda), a 4500g, 18 °C y durante 20 minutos. Recoger el ultrafiltrado.

Añadir 400 µL de agua ultrapura a 400 µL de la muestra (vino o ultrafiltrado) y 200 L de reactivo de Bradford (Bio-Rad, EE. UU.) en una cubeta semimicro (paso óptico: 10 mm).

Mezclar la solución dos veces, esperar 30 minutos y medir la absorbancia a 595 nm frente a agua ultrapura.

Para hallar la absorbancia de las proteínas (AP), hay que restar la absorbancia del ultrafiltrado (AUF) de la absorbancia del vino (AV):

$$A_P = A_V - A_{UF}$$

Preparar una curva de calibración con 5 concentraciones (de 0 a 20 mg/L) de albúmina sérica bovina (BSA) midiendo la absorbancia al cabo de 10 minutos de reacción. La concentración total de proteínas, en mg equivalentes de BSA por litro, se calcula con el valor medio de 3 mediciones distintas.

Se utilizan geles de poliacrilamida: un gel concentrador, con un grado de reticulación del 4 %, y un gel separador, con un grado de reticulación del 13 % (v. composición en el cuadro 1).

Las muestras se diluyen con amortiguador Laemmli 4 veces (3 volúmenes de muestra por cada volumen de amortiguador; Bio-Rad, EE. UU.) y se analizan por SDS-PAGE. Se utilizan marcadores de entre 10 kDa y 250 kDa (Precision Plus Protein TM Unstained

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

Standards, Bio-Rad, EE. UU.) como patrones. Los análisis se realizan por triplicado.

Cuadro 1. Composición de los geles separadores y concentradores (para 4 geles)

Composición	**Gel separador (13□%)**	**Gel concentrador (4□%)**
Agua ultrapura	6,2□mL	4,88□mL
Bisacrilamida (30□%)	8,6□mL	1,04□mL
Amortiguador Tris-HCl 1,5□M pH 8,8	5,0□mL	-
Amortiguador Tris-HCl 0,5□M pH 6,8	-	2,0□mL
Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10□%	0,2□mL	80□µL
Persulfato de amonio (PSA) 10□%	100□µL	40□µL
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	20□µL	8□µL

Los geles se introducen en un sistema de electroforesis vertical (p. ej.: Mini-PROTEAN III; Bio-Rad, EE.□UU.) a temperatura ambiente y se tiñen con azul de Coomassie R250.

Tras la migración, los geles se tiñen con nitrato de plata a temperatura ambiente (Rabilloud, 1994) (v. cuadro 2).

Cuadro 2. Tinción argéntica de geles de SDS-PAGE

Etapa	**Solución: concentración final**	**Duración**
Fijación	Etanol 99□%: 30□% *(v/v)* Ácido acético: 10□% *(v/v)*	Toda la noche
Sensibilización	Etanol 99□%: 20□% *(v/v)* Acetato de potasio: 0,5□M Tetrationato de potasio: 3□g/L Glutaraldehído 50□%: 1□% *(v/v)*	2 h 30 min (en la oscuridad)

© OIV 2021

Lavado	Agua ultrapura	3□×□20□min
Tinción	Nitrato de plata: 2□g/L Formaldehído 37□%: 0,7□mL/L	30□min
Lavado	Agua ultrapura	15□s
Desarrollo	Carbonato de potasio: 30□g/L Formaldehído 37□%: 0,5□mL/L Tiosulfato de sodio, $5H_2O$ 2,48□g/L: 3,75□mL/L	5□min
Parada	Tris: 50□g/L Ácido acético: 25□mL/L	5□min

3. RESULTADOS

La masa molecular de las quitinasas y las proteínas de tipo taumatina (TLP) es inferior a 15□kDa, mientras que la de las proteasas ronda los 40□kDa. Se puede realizar una primera observación de las proteínas residuales mediante análisis visual de los geles.

Para obtener resultados más precisos, digitalizar los geles de SDS-PAGE y analizarlos con un software específico.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Marchal R., Seguin V. et Maujean A. Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. American Journal of Enology and Viticulture, 1997, 48, 303-309.
2. Marchal R., Bouquelet S. et Maujean A. Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a Champenois Chardonnay wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 1716-1722.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021