RESOLUCIÓN OIV-OENO 573-2018

DETERMINACIÓN DE UNA ACTIVIDAD HEMICELULASA EN PREPARADOS ENZIMÁTICOS

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 iv del Acuerdo por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A propuesta del Grupo de expertos “Especificación de los Productos Enológicos”,

DECIDE añadir al capítulo 1 del Codex Enológico Internacional la ficha COEI-1-XYLANA:

Determinación de la actividad endo-1,4-β-xilanasa en preparados enzimáticos

(EC 3.2.1.8; N.o CAS: 9025-57-4)

Especificaciones generales

Las hemicelulasas de los preparados enzimáticos suelen encontrarse asociadas a otras enzimas formando complejos enzimáticos. A menos que se disponga lo contrario, las especificaciones deben ajustarse a la Resolución OENO 365-2009, relativa a las especificaciones generales de los preparados enzimáticos que se incluyen en el Codex Enológico Internacional.

1. Origen y aplicaciones

Las hemicelulasas catalizan la descomposición de las hemicelulosas. Las hemicelulosas de las paredes celulares de la uva están compuestas principalmente por xiloglucanos y arabinoxilanos; estos dos polisacáridos representan cerca del 90□% de las hemicelulosas de la uva.

Para evaluar la actividad hemicelulásica de los preparados enzimáticos, se mide la actividad 1,4 β xilanasa.

Los preparados enzimáticos con actividades hemicelulásicas se utilizan durante la maceración de la uva, la clarificación de mostos y vinos y para mejorar la filtrabilidad.

Los preparados enzimáticos que presentan este tipo de actividad proceden de fermentaciones dirigidas, por ejemplo con Aspergillus sp. o Trichoderma sp., o de la

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

mezcla de enzimas obtenidas de este modo.

2. Ámbito de aplicación

Para elaborar el método de determinación se utilizó una xilanasa comercial. Las condiciones y el método están diseñados para su aplicación a los preparados enzimáticos comerciales tal y como se encuentran en el mercado de productos enológicos.

3. Fundamento

Las xilanasas hidrolizan las cadenas de xilanos liberando en los extremos reductores residuos de monosacáridos. Para estimar la actividad xilanásica, se miden los monosacáridos reductores (xilosa) liberados durante la incubación según el método de Nelson (1944). En medio alcalino, el grupo hemiacetal de los azúcares reduce los iones cúpricos (Cu^{2+}). La reacción de estos últimos con el reactivo de arsenomolibdato produce una coloración azul, cuya absorbancia a 520 nm varía de forma lineal con la concentración de monosacáridos (entre 0 y 400 μg/mL).

4. Equipo

4.1. Agitador magnético con placa calefactora

4.2. Baño María a 40□°C

4.3. Baño María a 100□°C

4.4. Vaso de precipitados de 100 mL

4.5. Centrífuga para tubos de vidrio de 15 mL

4.6. Cronómetro

4.7. Matraces aforados de 100 mL

4.7.1. Matraz aforado de 500 mL

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

4.8. Jeringuilla de precisión de 200 □L

4.8.1. Jeringuilla de precisión de 1 mL

4.9. Pipeta recta de 10 mL graduada en décimas de mL

4.10. Espectrofotómetro

4.11. Tubos de vidrio de 15 mL

4.12. Agitadora vorticial

4.13. Frasco de vidrio ámbar de 500 mL

4.14. Cámara a 4□°C

4.15. Estufa a 37□°C

4.16. Algodón hidrófilo

4.17. Papel de estraza

4.18. pHmetro

4.19. Gradilla metálica para tubos de 15 mL

4.20. Cubetas desechables de 1 cm de paso óptico para espectrofotometría visible

5. Productos

5.1. Acetato de sodio (CH_3COONa, puro al 99□%, PM = 82 g/mol)

5.2. Ácido acético (CH_3COONa, puro al 96□%, PM = 60 g/mol, densidad = 1,058)

© OIV 2018

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

5.3. Xilano de haya (P-XYLNBE-10G; núm. de lote: 171004a de Megazyme)

5.4. Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4, puro al 99,5□%, PM = 142 g/mol)

5.5. Carbonato de sodio anhidro (Na_2SO_3, puro al 99,5□%, PM = 105,99 g/mol)

5.6. Tartrato de potasio y sodio ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$, puro al 99□%, PM = 282,2 g/mol)

5.7. Hidrogenocarbonato de sodio anhidro (Na_2HCO_3, puro al 98□%, PM = 84,01 g/mol)

5.8. Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$, puro al 99□%, PM = 249,68 g/mol)

5.9. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4, puro al 98□%)

5.10. Heptamolibdato de amonio ($(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$, puro al 99□%, PM = 1235,86 g/mol)

5.11. Hidrogenoarseniato de sodio ($Na_2HAsO_4.7H_2O$, puro al 98,5□%, PM = 312,02 g/mol)

5.12. D-Xilosa ($C_5H_{10}O_5$, pura al 99□%, PM = 150 g/mol)

5.13. Agua destilada

5.14. El preparado enzimático comercial que se vaya a analizar

6. Soluciones

6.1. Reactivos de la solución oxidante

Se deben preparar estos reactivos en primer lugar, ya que para la solución D se requiere un plazo de 24 horas.

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

6.1.1. Solución A: En un vaso de precipitados de 100 mL (4.4), verter por este orden:

- 20 g de sulfato de sodio anhidro (5.4),
- 2,5 g de carbonato de sodio anhidro (5.5),
- 2,5 g de tartrato de potasio y sodio (5.6),
- 2 g de hidrogenocarbonato de sodio anhidro (5.7).

Disolver en 80 mL de agua destilada (5.13). Calentar y mezclar (4.1) hasta que se disuelvan los solutos y verter en un matraz aforado de 100 mL (4.7). Enrasar con agua destilada (5.13).

Conservar a 37□°C (4.15); si se forma un precipitado, filtrar con un filtro de pliegues.

6.1.2. Solución B:

Disolver 15 g de sulfato de cobre pentahidratado (5.8) en 100 mL de agua destilada (5.13) y añadir una gota de ácido sulfúrico concentrado (5.9).

6.1.3. Solución C:

Esta solución se prepara en el momento, para garantizar una buena correspondencia entre la densidad del color y la cantidad de glucosa. Para prepararla, mezclar 1 mL de la solución B (6.1.2) con 24 mL de la solución A (6.1.1).

6.1.4. Solución D:

En un matraz aforado de 500 mL (4.7.1), disolver 25 g de heptamolibdato de amonio (5.10) en 400 mL agua (5.13). Añadir 25 mL de ácido sulfúrico concentrado (5.9), enfriado bajo el grifo de agua fría.

En un vaso de precipitados de 100 mL (4.4), disolver 3 g de hidrogenoarseniato de sodio (5.11) en 25 mL de agua (5.13) y transferir cuantitativamente al matraz aforado de 500 mL (4.7.1) que contiene el molibdato de amonio (5.10).

Enrasar a 500 mL con agua (5.13).

Conservar a 37□°C (4.15) durante 24 horas y después a 4□°C (4.14) en un frasco de vidrio ámbar de 500 mL (4.13).

6.2. Tampónde acetato de sodio (pH 4,2, 100 mmol/L)

Es una mezcla de dos soluciones (A y B):

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

6.2.1. Solución A (acetato de sodio 0,1 M): disolver 0,5 g de acetato de sodio (5.1) en 60 mL de agua destilada (5.13).

6.2.2. Solución B (ácido acético 0,1 M): diluir 1 mL de ácido acético (5.2) con 175 mL de agua destilada (5.13).

6.2.3. Preparación del tampónr de acetato de sodio: mezclar 23,9 mL de la solución A (6.2.1) y 76,1 mL de la solución B (6.2.2).

Comprobar el pH con un pHmetro(4.18).

Conservar la solución a 4□°C (4.14).

6.3. Solución de xilano de avena al 2□% (p/v)

En un matraz aforado de 100 mL (4.7), disolver 1 g de xilano de avena (5.3) en 100 mL de tampónde acetato de sodio (6.2).

6.4. Solución madre de xilosa (400 □g/mL)

Disolver 0,040 g de D-xilosa (5.12) en 100 mL de agua destilada (5.13).

7. Preparación de la serie de soluciones patrón de xilosa

Preparar una serie de soluciones patrón (de 0 à 400 µg/mL) a partir de la solución madre de xilosa (6.4), con arreglo al cuadro 1.

Cuadro 1. Serie de soluciones patrón de xilosa

Xilosa (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Xilosa (µmol/mL)	0	0.232	0.462	0.694	0.925	1.156	1.387	1.890
Vol. solución madre (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Vol. agua destilada (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

© OIV 2018

8. Preparación de la muestra

Antes de tomar la muestra, es fundamental homogeneizar el preparado enzimático, por ej., invirtiendo el recipiente. La solución enzimática y los blancos se deberán preparar en el momento.

8.1. Solución enzimática de 2 g/L

Poner 200 mg del preparado enzimático (5.14) en un matraz aforado de 100 mL (4.7), enrasar con agua destilada (5.13) y agitar para homogeneizar la mezcla.

8.2. Blanco desnaturalizado por calentamiento

Verter 10 mL de la solución enzimática de 2 g/L (8.1) en un tubo de 15 mL (4.11), tapar el tubo con algodón hidrófilo (4.16) y papel de estraza (4.17) y meterlo 5 min en el baño María a 100□°C (4.3).

9. Procedimiento

9.1. Reacción enzimática

Preparar los tubos como mínimo por duplicado.
En una gradilla (4.19), colocar 5 tubos de 15 mL (4.11) numerados del 1 al 5 y añadir:

- 200 µL de la solución enzimática de 2 g/l (8.1) con una jeringuilla de precisión de 200 µL (4.8),
- Introducir 400 µL de tampónde acetato de sodio (6.2) con otra jeringuilla de precisión de 1 mL (4.8.1),
- 600 µL de xilano de avena al 2 % (6.3). Poner en marcha el cronómetro (4.6).

Agitar (4.12), tapar los tubos con algodón hidrófilo (4.16) y papel de estraza (4.17) y meterlos en el baño María a 40□°C (4.2):

- 1 min el tubo n.o 1,
- 2 min el tubo n.o 2,
- 5 min el tubo n.o 3,

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

- 10 min el tubo n.o 4,
- 20 min el tubo n.o 5.

Para detener la reacción, sacar los tubos numerados del 1 al 5 del baño María a 40□°C y meter inmediatamente en el baño María a 100□°C (4.3) durante 10 min.
Por último, enfriar los tubos bajo el grifo de agua fría.

9.2. Determinación de las sustancias reductoras liberadas (xilosa)

En un tubo de 15 mL (4.11),
poner 1 mL del medio de reacción (9.1) y
añadir 1 mL de la solución C (6.1.3).
Agitar (4.12) y meter el tubo en el baño María a 100□°C (4.3) durante 10 min.
Enfriar el tubo bajo el grifo de agua fría.
Añadir 1 mL de la solución D (6.1.4).
Añadir 9,5 mL de agua (5.14) con una pipeta recta de 10 mL (4.9).
Esperar 10 min para que se estabilice el color.
Centrifugar (4.5) cada tubo a 5000 rpm durante 10 min.
Poner el sobrenadante en una cubeta (4.20).
Medir inmediatamente la absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro (4.10).

9.3. Blancos

Proceder como se describe en el apartado 9.1, pero sustituir la solución enzimática de 2 g/L (8.1) por el blanco desnaturalizado con calor (8.2). Lo ideal es que la reacción enzimática de los blancos se lleve a cabo al mismo tiempo que la de la solución enzimática.

9.4. Serie de soluciones patrón

Proceder como se describe en el apartado 9.2, pero sustituyendo el medio de reacción (9.1) por los distintos medios de la serie de soluciones patrón de xilosa de 0 a 400 µg/mL (7).

10. Cálculos

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

10.1. Cinética de la reacción

En general, para determinar la actividad enzimática es necesario que las cantidades de sustrato y de enzima no sean un factor limitante. De este modo, se distingue una fase ascendente, en la que la actividad enzimática es lineal en el tiempo. En caso contrario, se subestimaría la actividad enzimática (figura 1).

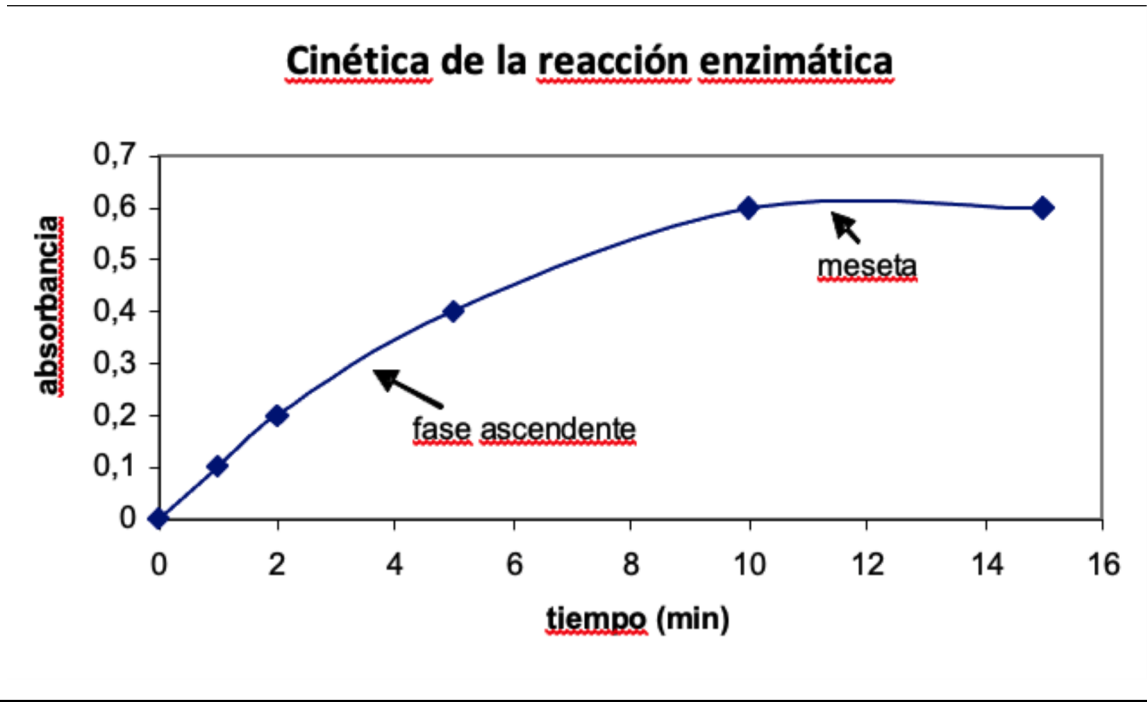


Figura 1. Cinética de una reacción enzimática

Determinar la cinética de la reacción a lo largo de 15 min, midiendo la actividad en cinco momentos: T = 1 min, T = 2 min, T = 5 min, T = 10 min y T = 15 min.

A continuación, obtener la curva de variación de la absorbancia en función del tiempo de reacción. El valor de absorbancia es la diferencia entre la absorbancia del preparado enzimático para un tiempo T y la del blanco correspondiente.

Calcular la ecuación (1) de la recta de regresión teniendo en cuenta solo los puntos de la fase ascendente (v. figura 1).

10.2. Recta de calibración

La recta de calibración es una gráfica con las concentraciones de la serie de

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

soluciones patrón de xilosa (de 0 a 1,89 μmol/mL) en el eje de abscisas y sus respectivos valores de absorbancia (9.4) en el eje de ordenadas. Calcular la pendiente (Q/T) de la recta de regresión (2) que resulta de la linealidad de los datos de la gráfica.

10.3. Cálculo de la actividad enzimática

A partir de la recta de regresión (1), calcular la absorbancia para un tiempo intermedio T (por ej., 4 min en la figura 1) e inferir la cantidad Q de xilosa liberada (en micromoles) para ese tiempo intermedio mediante la ecuación (2).

La actividad enzimática en U/g de preparado se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$Actividad\ en\ U/g\ = 1000 \times (Q/T)/(V \times C)$$

Donde

- Q es la cantidad de xilosa formada en micromoles durante un tiempo T (min),
- V es la cantidad de solución enzimática introducida (mL), en este caso 0,2 mL,
- C es la concentración de la solución enzimática (g/L), en este caso 2 g/L.

Actividad catalítica en nanokatales:

$$Actividad\ en\ nkat/g = (actividad\ en\ U/g) \times (1000/60)$$

Esta unidad equivale al número de nanomoles de producto formados por segundo.

11. Características del método

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

La repetibilidad del método se determina mediante la media de las desviaciones

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

estándar de los valores de absorbancia obtenidos con una misma muestra de preparado enzimático analizada 5 veces. En el caso de la determinación de la xilanasa, la media de las desviaciones estándar de los valores de absorbancia es 0,02, con un margen de error del 9,7□%. El margen de error corresponde a

(media de las desviaciones estándar de los valores de absorbancia × 100)

media de los valores de absorbancia de los ensayos

En consecuencia, el método de determinación presentado se considera repetible.

Los ensayos de reproducibilidad se han llevado a cabo con 2 preparados enzimáticos y tomando 5 muestras de cada uno.

Se han utilizado dos tests que permiten determinar la reproducibilidad del método:

- El análisis de la varianza (estudio de la probabilidad de que aparezcan diferencias entre las tomas de muestras). El análisis de la varianza es un método estadístico que permite contrastar la hipótesis de homogeneidad de un conjunto de k medias. El análisis de la varianza consiste en determinar si el efecto del tratamiento es significativo o no.
- La potencia estadística del ensayo a un nivel de riesgo α de primera especie (5 %). El riesgo α es la probabilidad de concluir que los tratamientos son distintos, cuando en realidad son iguales.

Si la potencia es baja (≅ 20□%), significa que no se ha detectado ninguna diferencia entre los tratamientos, pero si existiera habría pocas posibilidades de encontrarla.

Si la potencia es alta (≅ 80□%), significa que no se ha detectado ninguna diferencia entre los tratamientos, pero si existe alguna se dispone de los medios estadísticos para encontrarla.

Los resultados aparecen recogidos en el cuadro 2.

Determinación	Hipótesis del análisis de la varianza	Probalilidad	Potencia estadística del ensayo (□ = 5%)	Test de Newman-Keuls (*)	Test de Bonferroni (**)
Xilanasa	Respetadas	0.00087	93%	Significativo	Significativo

Cuadro 2. Análisis de la varianza: estudio del efecto del muestreo

* El test de Newman-Keuls es un test de comparación de medias que permite

© OIV 2018

Certificado conforme Punta del Este, 23 de noviembre de 2018

El Director General de la OIV

Secretario de la Asamblea General

Jean-Marie AURAND

establecer grupos homogéneos de tratamientos; se considera que dentro de un mismo grupo no hay diferencias a un nivel de riesgo □ dado.

** El test de Bonferroni, o test t de Bonferroni, permite hacer comparaciones de medias por parejas, es decir t(t−1)/2 comparaciones entre tratamientos, a un nivel de riesgo α dado.

Así pues, los ensayos realizados permiten encontrar una diferencia si existe en realidad (potencia estadística alta). Además, la probabilidad de que aparezca una desviación en la actividad (entre tomas de muestras) es inferior al 5□%, algo que corroboran los resultados de los tests de Newman-Keuls (no significativo) y de Bonferroni (no significativo).

12. Referencias bibliográficas

1. Nelson, N.: “A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose”, Journal of Biological Chemistry, May Institute for Medical Research of the Jewish Hospital, 1944, vol. 153, pp. 375-380.
2. Doco, T., y otros: “Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides”, Carbohydrate Polymers, 15 de agosto de 2003, vol. 53, n.o 3, pp. 253-261.

© OIV 2018