RÉSOLUTION OIV-OENO 625-2021

ÉVALUATION COMPARATIVE DE L'ACTIVITÉ PROTÉASE (ASPERGILLOPEPSINE I) DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU L'ARTICLE 2, paragraphe 2 b) ii de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

CONSIDÉRANT les travaux du Groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques»,

CONSIDÉRANT les résolutions OIV-OENO 541A-2021, « Utilisation d'Aspergillopepsine I afin d'éliminer les protéines responsables de la casse protéique dans le moût de raisin », et OIV-OENO 541B-2021, « Utilisation d'Aspergillopepsine I afin d'éliminer les protéines responsables de la casse protéique dans le vin »,

CONSIDÉRANT que cette détermination n'est adaptée qu'à la comparaison de l'activité protéolytique dans les préparations enzymatiques,

DÉCIDE sur proposition de la Commission II « Œnologie » d'ajouter la monographie suivante au chapitre 1 du Codex œnologique international :

ÉVALUATION COMPARATIVE DE L'ACTIVITÉ PROTÉASE (ASPERGILLOPEPSINE I) DANS LES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES

1. ORIGINE

Les préparations enzymatiques contenant une activité Aspergillopepsine I sont produites par fermentation contrôlée d'Aspergillus spp., Aspergillus niger en particulier.

Cette enzyme est communément désignée comme Aspergillopepsine I ou protéase acide d'Aspergillus (EC 3.4.23.18). Les protéases sont généralement présentes au sein de complexes enzymatiques. Sauf indication contraire, les spécifications de la résolution OENO 365-2009 doivent être conformes aux spécifications générales des préparations enzymatiques du Codex œnologique international.

Référence est faite au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

2. DOMAINE D'APPLICATION

Référence est faite au Code international des pratiques œnologiques et aux résolutions OIV-OENO 541A-2021 et OIV-OENO 541B-2021.

Les préparations enzymatiques ayant des activités protéases (Aspergillopepsine I) sont susceptibles de dégrader les protéines natives du moût ou du vin dans des conditions spécifiques de chauffage. Ces protéines posent des difficultés majeures lors des étapes de stabilisation des moûts et des vins. Ces protéases sont donc utilisées spécifiquement pour la clarification et la stabilisation des moûts et des vins riches en protéines.

Pour vérifier que le traitement a conduit à l'élimination des protéases (Aspergillopepsine I) et à la réduction de la teneur en protéines natives, les protéines contenues dans les vins finis peuvent être analysées au moyen de la méthode SDS-PAGE décrite en annexe I de la présente monographie.

3. PRINCIPE

Cette procédure est uniquement destinée à rendre compte du niveau d'activité protéase des préparations enzymatiques, exprimée en unités spectrophotométriques d'acide protéase (SAP), des préparations dérivées de, par exemple, Aspergillus niger et Aspergillus oryzae. L'essai est basé sur une hydrolyse enzymatique de 30 min d'un substrat de caséine (Hammarsten) à pH 3,0 et 37 °C. Le substrat non hydrolysé est précipité avec de l'acide trichloroacétique et extrait par filtration. La quantité de caséine solubilisée dans le filtrat est déterminée par spectrophotométrie (source : Codex des produits chimiques alimentaires FCC).

4. RÉACTIFS ET SOLUTIONS

4.1. Caséine : utiliser de la caséine selon Hammarsten (n° CAS : 9000-71-9, par ex. réf. produit Merck : 102242)

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

4.2. Tampon acide chlorhydrique-glycine (0,05 M) : dissoudre 3,75 g de glycine dans environ 800 mL d'eau. Additionner de l'acide chlorhydrique 1 M jusqu'à obtenir un pH 3,0, déterminé par un pHmètre. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

4.3. Solution de TCA : dissoudre 18,0 g d'acide trichloroacétique et 11,45 g d'acétate de sodium anhydre dans environ 800 mL d'eau, et additionner 21,0 mL d'acide acétique glacial. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

4.4. Solution substrat : introduire 8 mL d'acide chlorhydrique 1 M avec une pipette dans 500 mL d'eau, puis disperser 7,0 g (à l'état sec) de caséine (4.1) dans cette solution en agitant en continu. Chauffer 30 min dans un bain d'eau à ébullition, agiter occasionnellement, puis refroidir à température ambiante. Dissoudre 3,75 g de glycine dans la solution, et ajuster à pH 3,0 avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M en utilisant un pHmètre. Transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000 mL, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- Peser la préparation enzymatique, la transvaser quantitativement dans un mortier de verre, et triturer avec le tampon acide chlorhydrique-glycine (4.2).
- Transvaser quantitativement le mélange dans une fiole jaugée d'un volume approprié, porter au trait de jauge avec le tampon acide-chlorhydrique-glycine (4.2) et agiter.

La solution de la préparation enzymatique échantillon doit être préparée de manière à ce que 2 mL de la dilution finale donne une absorbance corrigée (entre 0,200 et 0,500) du filtrat de la solution enzymatique incubée à 275 nm (A, tel que défini dans le mode opératoire).

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

6. MODE OPÉRATOIRE

- Introduire 10,0 mL de la solution substrat (4.4) avec une pipette dans une série de tubes à essai de 25 × 150 mm, en prévoyant au moins deux tubes pour chaque échantillon, un pour chaque blanc d'enzymes et un pour un blanc de substrat.
- Boucher les tubes, et les équilibrer 15 min dans un bain d'eau maintenu à 37 ± 0,1 °C.
- Au temps zéro, lancer le chronomètre et transférer rapidement avec une pipette 2,0 mL de la préparation échantillon dans le substrat équilibré.
- Mélanger en tournoyant et replacer les tubes dans le bain d'eau (Remarque : Les tubes doivent être bouchés pendant l'incubation).
- Additionner 2 mL de tampon acide chlorhydrique-glycine (au lieu de la préparation échantillon) au blanc de substrat.
- Après exactement 30 min, additionner 10 mL de solution de TCA (4.3) à chaque solution enzymatique incubée et au blanc de substrat afin d'arrêter la réaction. (Attention : Ne pas procéder à un pipetage à la bouche pour le TCA).
- Préparer dans cet ordre un blanc d'enzyme contenant 10 mL de solution substrat, 10 mL de solution de TCA et 2 mL de préparation échantillon.
- Chauffer tous les tubes dans le bain d'eau pendant 30 min afin de permettre la coagulation complète des protéines précipitées.
- À la fin de la deuxième période de chauffage, refroidir les tubes dans un bain de glace pendant 5 min, puis filtrer au travers d'un papier filtre Whatman grade 42 ou équivalent. Les filtrats doivent être parfaitement clairs.
- Déterminer l'absorbance de chaque filtrat par rapport au blanc de substrat dans une cellule de 1 cm à 275 nm avec un spectrophotomètre adapté. Corriger chaque absorbance en soustrayant l'absorbance des blancs d'enzymes respectifs.

6.1. Courbe étalon

- Transvaser 181,2 mg de L-tyrosine, de classe chromatographique ou équivalent (n° CAS : 60-18-4, par ex. réf. produit Merck : 108371), préalablement séchés

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

jusqu'à poids constant, dans une fiole jaugée de 1000 mL.

- Dissoudre dans 60 mL d'acide chlorhydrique 0,1 M.
- Après dissolution complète, porter au trait de jauge avec de l'eau et agiter soigneusement. Cette solution contient 1,00 μmol/mL de tyrosine.
- Préparer des dilutions de cette solution mère, contenant 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 et 0,50 μmol/mL.
- Déterminer l'absorbance de chaque dilution par rapport au blanc d'eau dans une cellule de 1 cm à 275 nm.
- Préparer une courbe d'absorbance en fonction de la concentration en tyrosine en μmol/mL. La courbe obtenue doit être une ligne droite.
- Déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine afin de les employer dans les calculs ci-après. La valeur obtenue pour la pente devrait être proche de 1,38. La pente et l'ordonnée à l'origine peuvent être calculées par la méthode des plus petits carrés de la manière suivante :

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

$$Ordonnée\ à\ l'origine = \left[\sum(A)\sum(M)^2 - \sum(M)\sum(MA\right] / \left[n\sum(M^2) - (\sum M)^2\right]$$

où n est le nombre de points de la courbe étalon, M la concentration en tyrosine en µmol/ L pour chaque point de la courbe étalon, et A l'absorbance de l'échantillon.

6.2. Calculs

Une unité spectrophotométrique d'acide protéase correspond à l'activité nécessaire à la libération de 1 μmol de tyrosine par min sous les conditions spécifiées. L'activité est exprimée de la manière suivante :

$$SAP/g = (A - O) \times 22/(P \times 30 \times M)$$

où :

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

- A est l'absorbance corrigée du filtrat de la solution enzymatique incubée,
- O est l'ordonnée à l'origine de la courbe étalon,
- 22 est le volume final du mélange incubé, en mL,
- P est la pente de la courbe étalon,
- 30 est le temps d'incubation, en min, et
- M est la masse en g de l'échantillon d'enzymes contenu dans l'aliquote de 2,0 mL de la préparation échantillon additionnée au mélange d'incubation au cours du mode opératoire.

Annexe I. Analyse des protéines par méthode SDS-PAGE

1. PRINCIPE

L'essai est basé sur la méthode Bradford modifiée (Marchal et al., 1997 ; Marchal et al., 1996) combinée à une électrophorèse SDS-PAGE.

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford, en utilisant une ultrafiltration à 3 kDa de manière à réduire les interférences causées par l'éthanol et les composés phénoliques (Marchal et al., 1996), et une électrophorèse SDS-PAGE (dodécylsulfate de sodium-gel de polyacrylamide) destinée à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire (Laemmli, 1970).

2. MODE OPÉRATOIRE

- Soumettre les échantillons (vins avant traitement, vins venant d'être additionnés d'Aspergillopepsine I et vins après traitement) à une ultrafiltration avec des filtres centrifuges de 3 kDa (par ex. : Amicon® Ultra-4, Merck Millipore, Irlande) à 4500g pendant 20 minutes et à 18 °C. Collecter l'ultrafiltrat.
- Additionner 400 μL d'eau ultra-pure à 400 µL d'échantillon (vin ou ultrafiltrat) et 200 μL de réactif de Bradford (Bio-Rad, États-Unis) dans une cuvette semi-micro (trajet optique de 10 mm).
- Mélanger la solution deux fois et mesurer l'absorbance à 595 nm après 30 minutes en comparaison à l'eau ultra-pure.

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA
© OIV 2021

Pour obtenir l'absorbance des protéines (A_P), déduire l'absorbance de l'ultrafiltrat (A_{UF}) de celle du vin (A_V)

$A_P = A_V - A_{UF}$

Élaborer une courbe d'étalonnage avec cinq concentrations (de 0 à 20 mg/L) d'ASB (albumine de sérum bovin) en mesurant l'absorbance après 10 minutes de réaction. La teneur totale en protéines est calculée en mg/L éq. ASB, comme la valeur moyenne de trois mesures différentes.

Utiliser des gels de polyacrylamide à 4 % pour le gel de concentration et 13 % pour le gel de résolution (composition : tableau 1).

Mélanger les échantillons avec le tampon Laemmli quatre fois (trois volumes d'échantillon + un volume de tampon ; BioRad, États-Unis) et les analyser par SDS-PAGE. Utiliser comme étalons des marqueurs d'entre 10 et 250 kDa (Precision Plus Protein TM Unstained Standards, Bio-Rad, États-Unis). Procéder aux analyses en triple.

Gel de résolution (13 %)	**Composition**	**Gel de concentration (4 %)**
6,2 mL	Eau ultra-pure	4,88 mL
8,6 mL	Bis-acrylamide (30 %)	1,04 mL
5,0 mL	Tampon tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	-
-	Tampon tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,0 mL
0,2 mL	Dodécylsulfate de sodium (SDS) 10 %	80 µL
100 µL	Persulfate d'ammonium (APS) 10 %	40 µL
20 µL	Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	8 µL

Tableau 1. Composition des gels de résolution et de concentration (pour 4 gels)

Introduire les gels dans un système d'électrophorèse vertical (par ex. : Mini-PROTEAN III ; Bio-Rad, États-Unis) à température ambiante et colorés au bleu de Coomassie

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

R250.

Après migration, colorer les gels avec du nitrate d'argent à température ambiante (Rabilloud, 1994) en suivant les indications du tableau 2.

Tableau 2. Protocole de coloration argentique des gels de SDS-PAGE

Étape	Solution : concentration finale	Temps
Fixation	Éthanol 99 % : 30% *(v/v)* Acide acétique : 10 % *(v/v)*	Une nuit
Sensibilisation	Éthanol 99 % : 20 % *(v/v)* Acétate de potassium : 0,5 M Tétrathionate de potassium : 3 g/L Glutaraldéhyde 50 % : 1 % *(v/v)*	2 h 30 min (à l'obscurité)
Lavage	Eau ultra-pure	3 x 20 min
Coloration	Nitrate d'argent : 2 g/L Formaldéhyde 37 %: 0,7 mL/L	30 min
Lavage	Eau ultra-pure	15 s
Développement	Carbonate de potassium : 30 g/L Formaldéhyde 37 % : 0,5 mL/L Thiosulfate de sodium, $5H_2O$ 2,48 g/L : 3,75 mL/L	5 min
Arrêt	Tris : 50 g/L Acide acétique : 25 mL/L	5 min

3. RÉSULTATS

La masse moléculaire des chitinases et des TLP (protéines thaumatin-like) est inférieure à 15 kDa et celle des protéases est proche de 40 kDa. Une analyse visuelle des gels permet une première observation des protéines résiduelles.

Des résultats plus précis sont obtenus en numérisant les gels de SDS-PAGE et en les analysant avec un logiciel spécifique.

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021

4. BIBLIOGRAPHIE

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.

Exemplaire certifié conforme Paris réunion hybride, 12 juillet 2021
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2021