

## **RISOLUZIONE OIV-OENO 625-2021**

### **VALUTAZIONE COMPARATIVA DELL'ATTIVITÀ PROTEASICA (ASPERGILLOPEPSINA I) NELLE PREPARAZIONI ENZIMATICHE**

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo 2 b) ii dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

CONSIDERATE le risoluzioni OIV-OENO 541A-2021 "Utilizzo di Aspergillopepsina I per rimuovere le proteine responsabili della casse proteica nel mosto d'uva" e OIV-OENO 541B-2021 "Utilizzo di Aspergillopepsina I per rimuovere le proteine responsabili della casse proteica nel vino",

CONSIDERATO che questa determinazione è adatta solo a confrontare l'attività proteolitica nelle preparazioni enzimatiche,

DECIDE, su proposta della Commissione II "Enologia" di aggiungere la monografia seguente al capitolo 1 del Codex enologico internazionale:

### **VALUTAZIONE COMPARATIVA DELL'ATTIVITÀ PROTEASICA (ASPERGILLOPEPSINA I) NELLE PREPARAZIONI ENZIMATICHE**

#### **1. Origine**

Le preparazioni enzimatiche contenenti attività di Aspergillopepsina I sono prodotte mediante fermentazione controllata di *Aspergillus* spp., *Aspergillus niger* in particolare. Questo enzima viene solitamente denominato Aspergillopepsina I o proteasi acida da *Aspergillus* (EC 3.4.23.18). Le proteasi sono generalmente presenti come complessi enzimatici. Salvo disposizioni contrarie, le specificazioni della risoluzione OIV-OENO 365-2009 devono essere conformi alle specificazioni generali per le preparazioni enzimatiche del Codex enologico internazionale.

Fare riferimento al paragrafo 5 "Fonti di enzimi e ambienti di fermentazione" della monografia generale sulle preparazioni enzimatiche.

## 2. Scopo e campo di applicazione

Fare riferimento al Codice internazionale delle pratiche enologiche, nonché alle risoluzioni OIV-OENO 541A-2021 e OIV-OENO 541B-2021.

Le preparazioni enzimatiche contenenti attività proteasica (Aspergillopepsina I) hanno la capacità di degradare le proteine native presenti nei mosti e nei vini in specifiche condizioni di temperatura. Queste proteine provocano grandi difficoltà durante le fasi di chiarifica e stabilizzazione di mosti e vini. Tali proteasi sono quindi specificamente utilizzate nei trattamenti di stabilizzazione di mosti e vini ricchi di proteine.

Al fine di verificare che dopo il trattamento le proteasi (Aspergillopepsina I) siano state rimosse e che la concentrazione di proteine native sia ridotta, le proteine nei vini finiti possono essere analizzate utilizzando il metodo SDS-PAGE descritto nell'allegato I della presente monografia.

## 3. Principio

Il presente procedimento è volto esclusivamente a determinare l'attività proteolitica, espressa in unità spettrofotometriche di proteasi acida (SAPU), nelle preparazioni enzimatiche derivate, ad esempio, da *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Il test si basa su un'idrolisi enzimatica per 30 minuti di un substrato di caseina di Hammarsten a pH 3,0 e a 37 °C. Il substrato non idrolizzato viene precipitato con acido tricloroacetico e rimosso mediante filtrazione. La quantità di caseina solubilizzata nel filtrato viene determinata tramite spettrofotometria (riferimento: Food Chemicals Codex).

## 4. Reagenti e soluzioni

**4.1. Caseina: Utilizzare della caseina di grado Hammarsten (n. CAS 9000-71-9, ad es. codice articolo Merck 102242).**

**4.2. Tampone glicina-acido cloridrico (0,05 M): Disciogliere 3,75 g di glicina in circa 800 mL di acqua. Aggiungere acido cloridrico 1 M finché la soluzione non raggiunge pH 3,0 (determinazione tramite pHmetro). Trasferire quantitativamente la soluzione in un matraccio graduato da 1000 mL, diluire portando a volume con acqua e miscelare.**

**4.3. Soluzione di TCA: Disciogliere 18,0 g di acido tricloroacetico e 11,45 g di acetato di sodio anidro in circa 800 mL di acqua e aggiungere 21,0 mL di acido acetico glaciale. Trasferire quantitativamente la soluzione in un matraccio graduato da 1000 mL, diluire portando a volume con acqua e miscelare.**

**4.4. Soluzione substrato: Pipettare 8 mL di acido cloridrico 1 M in circa 500 mL di acqua e disperdere in questa soluzione 7,0 g di caseina (priva di umidità) (4.1), agitando continuamente. Riscaldare per 30 minuti in bagnomaria bollente, mescolando di tanto in tanto, e lasciar raffreddare a temperatura ambiente. Disciogliere 3,75 g di glicina nella soluzione e, avvalendosi di un pH-metro, portare a pH 3,0 con acido cloridrico 0,1 M. Trasferire quantitativamente la soluzione in un matraccio graduato da 1000 mL, diluire portando a volume con acqua e miscelare.**

## **5. Preparazione del campione**

- Pesare la preparazione enzimatica, trasferirla quantitativamente in un mortaio di vetro e tritarla con il tampone glicina-acido cloridrico (4.2).
- Trasferire quantitativamente la miscela in un matraccio graduato di dimensioni adeguate, diluire portando a volume con il tampone glicina-acido cloridrico (4.2) e miscelare.

Preparare una soluzione della preparazione enzimatica campione in modo che 2 mL della diluizione finale consentano di misurare un'assorbanza corretta del filtrato enzimatico di incubazione tra 0,200 e 0,500 a 275 nm (A, come definito nel procedimento).

## **6. Procedimento**

- Pipettare 10,0 mL di soluzione di substrato (4.4) in ciascuna serie di provette da 25 x 150 mm; per ciascun campione devono essere usate almeno due provette: una per il bianco dell'enzima e una per il bianco del substrato.
- Tappare le provette ed equilibrarle per 15 minuti a bagnomaria mantenuto a una temperatura di  $37\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ .

- A tempo zero, avviare il cronometro e pipettare rapidamente 2,0 mL della preparazione campione nel substrato equilibrato.
- Miscelare con un movimento rotatorio e porre nuovamente le provette nel bagnomaria. (Nota: Le provette devono restare tappate durante l'incubazione).
- Nel bianco del substrato aggiungere 2 mL di tampone glicina-acido cloridrico (invece della preparazione campione).
- Dopo 30 minuti esatti, aggiungere 10 mL di soluzione di TCA (4.3) ad ogni incubato enzimatico e al bianco del substrato per fermare la reazione. (Attenzione: Non aspirare la soluzione di TCA tramite bocca).
- Preparare un bianco enzimatico aggiungendo, nell'ordine seguente: 10 mL di soluzione di substrato, 10 mL di soluzione di TCA e 2 mL di preparazione campione.
- Riscaldare tutte le provette in un bagnomaria per 30 minuti, per provocare la coagulazione completa della proteina precipitata.
- Al termine del secondo periodo di riscaldamento, raffreddare le provette in un bagno di ghiaccio per 5 minuti e filtrare attraverso la carta da filtro Whatman n. 42 o equivalente. I filtrati devono essere perfettamente limpidi.
- Utilizzando uno spettrofotometro adeguato, determinare l'assorbanza di ciascun filtrato contro il bianco del substrato utilizzando una cella con cammino ottico di 1 cm e a una lunghezza d'onda di 275 nm. Correggere ogni assorbanza sottraendo il valore dell'assorbanza del rispettivo bianco enzimatico.

## 6.1. Curva di calibrazione

- In un matraccio graduato da 1000 mL, trasferire 181,2 mg di L-tirosina di grado cromatografico o equivalente (n. CAS 60-18-4, ad es. codice articolo Merck 108371) precedentemente essiccati fino a peso costante.
- Disciogliere in 60 mL di acido cloridrico 0,1 M.
- Una volta completamente disciolti, diluire la soluzione con acqua fino a portarla a volume e miscelare accuratamente. Questa soluzione contiene 1,00  $\mu\text{mol}$  di tirosina in 1,0 mL.
- Da questa soluzione madre preparare le diluizioni affinché contengano 0,10, 0,20,

0,30, 0,40 e 0,50  $\mu\text{mol}$  per mL.

- Determinare l'assorbanza di ciascuna diluizione contro il bianco d'acqua utilizzando una cella con cammino ottico di 1 cm e a una lunghezza d'onda di 275 nm.
- Preparare il grafico assorbanza vs.  $\mu\text{mol}$  di tirosina per mL. Si deve ottenere una linea retta.

Determinare pendenza e intercetta, da utilizzare nell'equazione presente di seguito al punto "Calcoli". Si dovrebbe ottenere un valore prossimo a 1,38 per la pendenza. È possibile calcolare pendenza e intercetta tramite il metodo dei minimi quadrati, come segue:

$$\text{Pendenza} = \left[ n \sum (MA) - \sum (M) \sum (A) \right] / \left[ n \sum (M^2) - (\sum M)^2 \right]$$

$$\text{Intercetta} = \left[ \sum (A) \sum (M^2) - \sum (M) \sum (MA) \right] / \left[ n \sum (M^2) - (\sum M)^2 \right]$$

dove n rappresenta il numero di punti della curva di calibrazione, M rappresenta le  $\mu\text{mol}$  di tirosina per mL per ciascun punto della curva di calibrazione e A rappresenta l'assorbanza del campione.

## 6.2. Calcoli

Un'unità spettrofotometrica di proteasi acida rappresenta l'attività in grado di liberare 1  $\mu\text{mol}$  di tirosina al minuto alle condizioni specificate. L'attività si esprime come segue:

$$\text{SAPU/g} = (A - I) \times 22 / (S \times 30 \times W)$$

dove:

- **A** rappresenta il valore dell'assorbanza corretta del filtrato enzimatico di incubazione,
- **I** rappresenta l'intercetta della curva di calibrazione,
- **22** rappresenta il volume finale della miscela di incubazione, espresso in mL,
- **P** rappresenta la pendenza della curva di calibrazione,

- **30** rappresenta il tempo di incubazione, espresso in minuti, e
- **W** rappresenta il peso, espresso in grammi, del campione enzimatico contenuto in un'aliquota di 2,0 mL di preparazione campione aggiunta alla miscela di incubazione del procedimento.

## **Allegato I Saggio SDS-PAGE per l'analisi delle proteine**

### **1. Principio**

Il presente saggio si basa sul metodo di Bradford modificato (Marchal et al., 1997; Marchal et al., 1996), combinato con l'elettroforesi SDS-PAGE.

La quantificazione delle proteine avviene avvalendosi del saggio di Bradford, utilizzando un'ultrafiltrazione a 3kDa per ridurre le interferenze dovute all'etanolo e ai composti fenolici (Marchal et al., 1996) nonché l'elettroforesi SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) per separare le proteine in base al loro peso molecolare (Laemmli, 1970).

### **2. Procedimento**

Sottoporre i campioni (vini prima del trattamento, vini con aggiunta recente di Aspergillopepsina I, vini dopo il trattamento) a ultrafiltrazione usando filtri per centrifuga da 3 kDa (ad esempio: Amicon® Ultra-4, Merck Millipore, Irlanda) a 4500g per 20 minuti a 18 °C; procedere quindi alla raccolta dell'ultrafiltrato.

In una cuvetta semi-micro (cammino ottico di 10 mm) aggiungere 400 µL di campione (vino o ultrafiltrato), 400 µL di acqua ultrapura e 200 µL di reattivo di Bradford (Bio-Rad, USA).

Miscelare la soluzione due volte e dopo 30 minuti misurare l'assorbanza a 595 nm rispetto all'acqua ultrapura.

Per ottenere l'assorbanza delle proteine ( $A_P$ ) è necessario sottrarre il valore dell'assorbanza dell'ultrafiltrato ( $A_{UF}$ ) dal valore dell'assorbanza del vino ( $A_V$ ):

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

La curva di calibrazione si ottiene con 5 concentrazioni (da 0 a 20 mg/L) di BSA (sieroalbumina bovina) misurando l'assorbanza dopo 10 minuti di reazione. Il tenore

proteico totale è rappresentato dal valore medio di 3 diverse misure e si esprime in mg/L eq. di BSA.

Si utilizzano gel di poliacrilammide al 4% per l'impaccamento e al 13% per la risoluzione (composizione illustrata in tabella 1).

I campioni vengono miscelati con il buffer Laemmli 4X (3 volumi di campione + 1 volume di buffer; Bio-Rad, USA) e analizzati mediante SDS-PAGE. Come standard si utilizzano marcatori da 10 a 250 kDa: Unstained Standards - Precision Plus Protein™, Bio-Rad, USA. Le analisi vengono eseguite in triplo.

*Tabella 1. Composizione del gel di impaccamento e del gel di risoluzione (per 4 gel)*

Composizione	Gel di risoluzione (13%)	Gel di impaccamento (4%)
Acqua ultrapura	6.2 mL	4.88 mL
Bis-acrilammide (30%)	8.6 mL	1.04 mL
Buffer Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	5.0 mL	-
Buffer Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	-	2.0 mL
Sodio dodecil solfato (SDS) 10%	0.2 mL	80 µL
Persolfato d'ammonio (APS) 10%	100 µL	40 µL
Tetrametiletilendiammina (TEMED)	20 µL	8 µL

La corsa su gel avviene avvalendosi di un apparato per elettroforesi verticale (ad esempio: Mini-PROTEAN III; Bio-Rad, USA) a temperatura ambiente e la colorazione avviene con blu di Coomassie R250.

Dopo la migrazione, i gel vengono colorati con nitrato d'argento a temperatura ambiente secondo Rabilloud (1994) (cfr. tabella 2).

*Tabella 2. Protocollo per la colorazione argentea dei gel SDS-PAGE*

Fase	Soluzione: concentrazione finale	Durata
------	----------------------------------	--------

Fissazione	Etanolo al 99%: 30% (v/v) Acido acetico: 10% (v/v)	Intera notte
Sensitizzazione	Etanolo al 99%: 20% (v/v) Acetato di potassio: 0,5 M Tetrato di potassio: 3 g/L Glutaraldeide al 50%: 1% (v/v)	2 ore e 30 min (al buio)
Lavaggio	Acqua ultrapura	3 x 20 min
Colorazione	Nitrato d'argento: 2 g/L Formaldeide al 37%: 0,7 mL/L	30 min
Lavaggio	Acqua ultrapura	15 s
Sviluppo	Carbonato di potassio: 30 g/L Formaldeide al 37%: 0,5 mL/L Tiosolfato di sodio, 5H <sub>2</sub> O 2,48 g/L: 3,75 mL/L	5 min
Arresto	Tris: 50 g/L Acido acetico: 25 mL/L	5 min

### 3. Risultati

Il peso molecolare delle chitinasi e delle TLP (proteine taumatina-simili) è inferiore a 15 kDa e quello delle proteasi si avvicina ai 40 kDa. Un'analisi visiva dei gel consente un'osservazione iniziale delle proteine residue.

I risultati precisi si ottengono in seguito alla digitalizzazione dei gel SDS-PAGE e all'analisi con un software specifico.

### 4. Bibliografia

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.