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.

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

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 pH-metro). Trasferire quantitativamente la soluzione in un matraccio graduato da 1000 mL, diluire portando a volume con acqua e miscelare.

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

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 triturarla 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 °C ± 0,1 °C.

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

- 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 μmol di tirosina in 1,0 mL.
- Da questa soluzione madre preparare le diluizioni affinché contengano 0,10, 0,20,

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

0,30, 0,40 e 0,50 μmol 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. µmol 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:

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

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

dove n rappresenta il numero di punti della curva di calibrazione, M rappresenta le μ 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 μmol di tirosina al minuto alle condizioni specificate. L'attività si esprime come segue:

SAPU/g = (A - I) x 22 / (S x 30 x 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,

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

- **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

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

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 ProteinTM, 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 argentica dei gel SDS-PAGE

Fase	**Soluzione: concentrazione finale**	**Durata**

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

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 Tetrationato 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, $5H_2O$ 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

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12 Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2021

characterization of glycoproteins in a Champenois Chardonnay wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 1716-1722.

© OIV 2021

Esemplare certificato conforme Parigi, riunione ibrida, 12
Luglio 2021
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA