RISOLUZIONE OIV-OENO 573-2018

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ EMICELLULASICA NEI PREPARATI ENZIMATICI

L'ASSEMBLEA GENERALE,

Visto l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

Su proposta del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

DECIDE di aggiungere al capitolo 1 del Codex enologico internazionale la scheda COEI-1-XYLANA :

Determinazione dell'attività della endo-1,4-β-xilanasi nei preparati enzimatici

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

Specifiche generali

Tra le attività presenti nei preparati enzimatici, figurano anche quelle delle emicellulasi nella forma di complesso enzimatico. Salvo indicazione contraria, le specifiche devono essere conformi a quanto riportato nella risoluzione OENO 365-2009 relativa alle specifiche generali dei preparati enzimatici presenti nel Codex enologico internazionale.

1. Origine e utilizzo

Le emicellulasi catalizzano la degradazione delle emicellulose. Le emicellulose delle pareti cellulari degli acini d'uva sono principalmente costituite da xiloglucani e arabinoxilani. Questi due polisaccaridi costituiscono circa il 90% delle emicellulose dell'uva.

L'attività emicellulasica presente nei preparati enzimatici viene determinata misurando l'attività della 1,4-β-xilanasi.

I preparati enzimatici che contengono attività emicellulasica sono utilizzati durante la macerazione dell'uva, la chiarifica di mosti e vini, nonché per migliorare la filtrabilità.

I preparati enzimatici che presentano questo tipo di attività sono ottenuti da fermentazioni eseguite, ad esempio, utilizzando Aspergillus sp. o Trichoderma sp., o

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

loro miscele così ottenute.

2. Campo d'applicazione

Il metodo di quantificazione è stato messo a punto utilizzando una xilanasi disponibile in commercio. Le condizioni e il metodo sono stati sviluppati perché possano essere applicati ai preparati enzimatici commerciali, come ad esempio quelli presenti sul mercato enologico.

3. Principio

Le xilanasi idrolizzano le catene degli xilani liberando le estremità riducenti dei monosaccaridi costitutivi. La misurazione dell'attività della xilanasi si basa sulla misurazione dei monosaccaridi riduttori (xilosio) che vengono liberati durante il periodo di incubazione, secondo il metodo di Nelson (1944). In un mezzo alcalino, il gruppo pseudoaldeidico degli zuccheri riduce gli ioni rameici Cu^{2+}. Questi ultimi reagiscono con il reagente arsenomolibdico, producendo una colorazione blu la cui assorbanza, misurata a 520 nm, varia in modo lineare con la concentrazione dei monosaccaridi (tra 0 e 400 μg/mL).

4. Apparecchiatura

4.1. Agitatore magnetico con piastra riscaldante

4.2. Bagnomaria a 40 °C

4.3. Bagnomaria a 100 °C

4.4. Cilindro da 100 mL

4.5. Centrifuga per provette in vetro da 15 mL

4.6. Cronometro

4.7. Matracci graduati da 100 mL

4.7.1. Matraccio graduato da 500 mL

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

4.8. Siringa di precisione da 200 µL

4.8.1. Siringa di precisione da 1 mL

4.9. Pipetta da 10 mL, con graduazione di 0,1 mL

4.10. Spettrofotometro

4.11. Provette in vetro da 15 mL

4.12. Agitatore di tipo vortex

4.13. Contenitore di vetro ambrato da 500 mL

4.14. Camera termostatica a 4 °C

4.15. Forno a 37 °C

4.16. Cotone cardato

4.17. Carta Kraft

4.18. pH-metro

4.19. Portaprovette in metallo per provette da 15 mL

4.20. Cuvette con cammino ottico di 1 cm, monouso, per misure spettrofotometriche nel visibile

5. Prodotti

5.1. Acetato di sodio (CH_3COONa, di purezza pari al 99% - PM = 82 g/mol)

5.2. Acido acetico (CH_3COOH), di purezza pari al 96% - PM = 60 g/mol, densità = 1,058)

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

5.3. Xilano (Beechwood) P-XYLNBE-10G, lotto n. 171004a Megazyme

5.4. Solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), di purezza pari al 99,5% - PM = 142 g/mol)

5.5. Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3, di purezza pari al 99,5% - PM = 105,99 g/mol)

5.6. Tartrato di potassio e di sodio ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$), di purezza pari al 99% - PM = 282,2 g/mol)

5.7. Idrogenocarbonato di sodio anidro ($NaHCO_3$), di purezza pari al 98% - PM = 84,01 g/mol)

5.8. Solfato di rame pentaidrato ($CuSO_4.5H_2O$), di purezza pari al 99% - PM = 249,68 g/mol)

5.9. Acido solforico concentrato (H_2SO_4, di purezza pari al 98%)

5.10. Eptamolibdato d'ammonio ((NH4) 6Mo7O24·4H2O, di purezza pari al 99% - PM = 1235,86 g/mol)

5.11. Idrogeno arseniato di sodio (Na2HAsO4·7H2O, di purezza pari al 98,5% - PM = 312,02 g/mol)

5.12. D-xilosio ($C_5H_{10}O_5$), di purezza pari al 99% - PM = 150 g/mol)

5.13. Acqua distillata

5.14. Preparato enzimatico commerciale per analisi

6. Soluzioni

6.1. Reagenti della soluzione ossidante

Questi reagenti devono essere preparati in anticipo, tenendo conto delle 24 ore

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

necessarie per la soluzione D.

6.1.1. Soluzione A

In un cilindro da 100 mL (4.4) porre in successione:

- 20 g di solfato di sodio anidro (5.4),
- 2,5 g di carbonato di sodio anidro (5.5),
- 2,5 g di tartrato di potassio e di sodio (5.6),
- 2 g di idrogenocarbonato di sodio anidro (5.7).

Disciogliere in 80 mL di acqua distillata (5.13). Riscaldare e miscelare (4.1) fino a dissoluzione e trasferire in un matraccio da 100 mL (4.7). Portare a volume con acqua distillata (5.13).
Conservare a 37 °C (4.15); in caso si formino dei depositi, filtrare su un filtro a pieghe.

6.1.2. Soluzione B

Disciogliere 15 g di solfato di rame pentaidrato (5.8) in 100 mL di acqua distillata (5.13) e aggiungere una goccia di acido solforico concentrato (5.9).

6.1.3. Soluzione C

Per garantire una adeguata proporzione tra densità del colore e quantità di glucosio, questa soluzione viene preparata in anticipo miscelando 1 mL di soluzione B (6.1.2) con 24 mL di soluzione A (6.1.1).

6.1.4. Soluzione D

In un matraccio graduato da 500 mL (4.7.1), disciogliere 25 g di eptamolibdato d'ammonio (5.10) in 400 mL di acqua (5.13). Aggiungere 25 mL di acido solforico concentrato (5.9) (raffreddati sotto un flusso d'acqua fredda).
In un cilindro da 100 mL (4.4) disciogliere 3 g di idrogeno arseniato di sodio (5.11) in 25 mL di acqua (5.13) e trasferire quantitativamente in un matraccio graduato da 500 mL (4.7.1) contenente il molibdato d'ammonio (5.10).
Portare a un volume finale di 500 mL con acqua (5.13).
Conservare per 24 ore a 37 °C (4.15) e poi a 4 °C (4.14) in un contenitore di vetro ambrato da 500 mL (4.13).

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND
© OIV 2018

6.2. Tampone acetato di sodio (pH 4,2, 100 mmol/L)

È costituito dalle soluzioni A e B.

6.2.1. Soluzione A (acetato di sodio 0,1 M): disciogliere 0,5 g di acetato di sodio (5.1) in 60 mL di acqua distillata (5.13).

6.2.2. Soluzione B (acido acetico 0,1 M): diluire 1 mL di acido acetico (5.2) con 175 mL di acqua distillata (5.13).

6.2.3. Preparazione del tampone acetato di sodio: miscelare 23,9 mL di soluzione A (6.2.1) + 76,1 mL di soluzione B (6.2.2).

Verificare il pH del tampone mediante un pH-metro (4.18).

La soluzione deve essere conservata a 4 °C (4.14).

6.3. Soluzione di xilano d'avena al 2% (p/v)

In un matraccio graduato da 100 mL (4.7), disciogliere 1 g di xilano d'avena (5.3) in 100 mL di tampone acetato di sodio (6.2).

6.4. Soluzione madre di xilosio a una concentrazione di 400 µg/mL

Disciogliere 0,040 g di D-xilosio (5.12) in 100 mL d'acqua distillata (5.13).

7. Preparazione della serie di soluzioni standard di xilosio

Preparare la serie di soluzioni standard (da 0 a 400 µg/mL) a partire dalla soluzione madre di xilosio (6.4) come illustrato nella tabella 1.

Tabella 1: Serie di soluzioni standard di xilosio

Xilosio (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	400
Xiolosio (µmol/mL)	0	0.232	0.462	0.694	0.925	1.156	1.387	1.890
Volume soluzione madre (µL) (6.4.)	0	125	250	375	500	625	750	1000
Volume acqua distillata (µL) (5.13)	1000	875	750	625	500	375	250	0

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

8. Preparazione del campione

È importante omogeneizzare il preparato enzimatico prima del prelievo del campione, per esempio tramite il capovolgimento del contenitore. La soluzione enzimatica e i bianchi dovranno essere preparati al momento.

8.1. Soluzione enzimatica a una concentrazione di 2 g/L

Porre 200 mg di preparato enzimatico (5.14) in un matraccio da 100 mL (4.7), portare a volume con acqua distillata (5.13), agitare al fine di ottenere una miscela omogenea.

8.2. Bianco denaturato tramite riscaldamento

Porre 10 mL della soluzione enzimatica a una concentrazione di 2 g/L (8.1) in una provetta da 15 mL (4.11), tappare con cotone cardato (4.16) ricoperto da carta Kraft (4.17) e immergere la provetta per 5 min nel bagnomaria a 100 °C (4.3).

9. Procedimento

9.1. Reazione enzimatica

Preparare le provette almeno in doppio.

Nelle 5 provette da 15 mL (4.11) numerate da 1 a 5, sistemate in un portaprovette (4.19), introdurre:

- 200 µL della soluzione enzimatica alla concentrazione di 2 g/L (8.1), con l'aiuto di una siringa di precisione di 200 µL (4.8),
- Introdurre 400 µL di tampone acetato di sodio (6.2), con l'aiuto di una siringa di precisione di 1 mL (4.8.1),
- 600 µL di xilano d'avena al 2% (6.3),
- azionare il cronometro (4.6).

Dopo l'agitazione (4.12), porre le provette sigillate col cotone cardato (4.16) e la carta Kraft (4.17) in un bagnomaria a 40 °C (4.2):

- per 1 min per la provetta n. 1,
- per 2 min per la provetta n. 2,

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

- per 5 min per la provetta n. 3,
- per 10 min per la provetta n. 4,
- per 20 min per la provetta n. 5.

La reazione si arresta mettendo ciascuna delle provette, numerate da 1 a 5, nel bagnomaria a 100 °C (4.3) per 10 min, immediatamente dopo averle tolte dal bagnomaria a 40 °C.

Successivamente, raffreddare le provette mettendole sotto un flusso d'acqua fredda.

9.2. Determinazione delle sostanze riducenti rilasciate (in questo caso lo xilosio)

In una provetta da 15 mL (4.11) porre 1 mL di mezzo di reazione (9.1), aggiungere 1 mL di soluzione C (6.1.3). Dopo l'agitazione (4.12), porre le provette a bagnomaria a 100 °C (4.3) per 10 min.

Successivamente, raffreddare la provetta mettendola sotto un flusso d'acqua fredda.

Aggiungere 1 mL di soluzione D (6.1.4). Avvalendosi di una pipetta da 10 mL (4.9), aggiungere 9,5 mL di acqua (5.14). Attendere 10 min affinché si stabilizzi il colore. Centrifugare (4.5) ogni provetta a 5000 rpm per 10 min.

Porre il surnatante in una cuvetta (4.20).

Mediante uno spettrofotometro (4.10), misurare subito l'assorbanza a 520 nm.

9.3. Bianchi

Procedere come descritto al punto 9.1 sostituendo la soluzione enzimatica alla concentrazione di 2 g/L (8.1) con il bianco denaturato tramite il calore (8.2). L'ideale sarebbe realizzare la reazione enzimatica dei bianchi contemporaneamente a quella della soluzione enzimatica.

9.4. Serie di soluzioni standard

Procedere come descritto al punto 9.2 sostituendo il mezzo di reazione (9.1) con i diversi mezzi di soluzione standard di xilosio da 0 a 400 µg/mL (7).

10. Calcoli

10.1. Realizzazione della cinetica di reazione

In generale, il calcolo dell'attività enzimatica può essere effettuato solo quando il

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

substrato e l'enzima non sono in quantità limitanti. Ci si colloca quindi nella fase ascendente del grafico della cinetica: l'attività enzimatica è lineare nel tempo. In caso contrario, l'attività sarebbe sottostimata (figura 1).

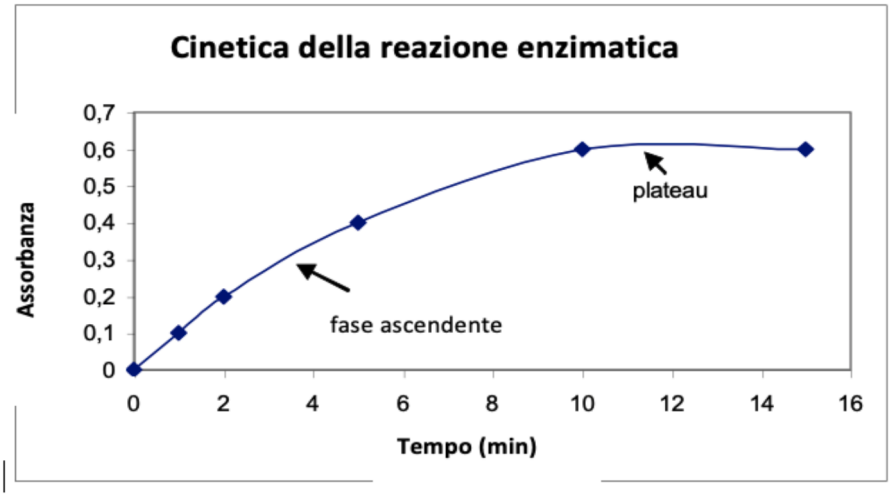


Figura 1: Cinetica della reazione enzimatica

Determinare la cinetica per 15 min. Misurare l'attività relativa a t=1 min, t=2 min, t=5 min, t=10 min e t=15 min.

Dopo aver determinato la cinetica della reazione enzimatica, tracciare la curva di variazione dell'assorbanza in funzione dei tempi di reazione. L'assorbanza corrisponde alla differenza tra l'assorbanza del preparato enzimatico al tempo t e quella del bianco corrispondente.

Calcolare poi l'equazione (1) della retta di regressione tenendo conto solamente dei punti della fase ascendente (vedi figura 1).

10.2 Calcolo della retta di calibrazione

La retta di calibrazione corrisponde a un grafico in cui l'ascissa è rappresentata dalle differenti concentrazioni della serie di soluzioni standard di xilosio (da 0 a 1,89 µmol/mL) e l'ordinata è rappresentata dai valori delle relative densità ottiche, ottenute al punto 9.4. Calcolare poi la pendenza (Q/t) della retta di regressione (2) che risulta dalla linearità dei dati del grafico.

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

10.2. Calcolo dell'attività enzimatica

A partire dalla retta di regressione (1), calcolare l'assorbanza per un tempo medio t (per esempio 4 min per il caso descritto nella figura 1), ricavare la quantità Q di xilosio liberato (in micromoli) per questo tempo intermedio mediante l'equazione (2).

L'attività enzimatica in U/g di preparato viene calcolata attraverso la formula seguente:

$$Attività\ in\ U/g\ =\ 1000 \times (Q/t)/(V \times C)$$

Dove:

Q = quantità di xilosio formato in µmoli durante il tempo t (min)

V = quantità di soluzione enzimatica introdotta (mL), in questo caso 0,2 mL

C = concentrazione della soluzione enzimatica (g/L), in questo caso 2 g/L

Attività catalitica espressa in nanokatal:

$$Attività\ in\ nkat/g = (attività\ in\ U/g) \times (1000/60)$$

Questa unità corrisponde al numero di nanomoli di prodotto che si forma in 1 secondo.

11. Caratteristiche del metodo

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

La ripetibilità del presente metodo è stimata mediante la media degli scarti tipo dei valori di assorbanza ottenuti da uno stesso prelievo di preparato enzimatico, determinata 5 volte. Pertanto, per la determinazione della xilanasi, la media degli scarti tipo dei valori è 0,02 con una percentuale di errore del 9,7%. La % di errore corrisponde a:

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

(media degli scarti tipo dei valori x 100)

media dei valori del test

In questo modo, il metodo di determinazione presentato è giudicato ripetibile.

I test di riproducibilità sono stati effettuati mediante 2 preparati enzimatici e 5 prelievi di campioni da ognuno di essi.

Sono stati utilizzati 2 test che hanno permesso di determinare la buona riproducibilità del metodo:

- L'analisi della varianza (studio della probabilità che si verifichino delle variazioni tra i prelievi di campione). L'analisi della varianza è un metodo statistico che consente di verificare l'ipotesi di omogeneità di un insieme di k medie. Effettuare l'analisi della varianza significa determinare se l'effetto del trattamento sia o meno significativo.
- La potenza del test con errore di prima specie (5%). L'errore di prima specie rappresenta il rischio di arrivare alla conclusione che trattamenti effettivamente identici siano diversi.

Se la potenza è bassa (≅ 20%), significa che tra i trattamenti non è stata rilevata alcuna differenza, tuttavia esiste una possibilità minima di osservare una differenza qualora ve ne sia veramente una.

Se la potenza è elevata (≅ 80%), significa che tra i trattamenti non è stata rilevata alcuna differenza, tuttavia qualora ve ne sia veramente una, si disporrebbe dei mezzi per osservarla.

I risultati sono riportati nella tabella 2.

Dosaggi	Ipotesi dell'analisi della varianza	Probabilità	Potenza del test (= 5%)	Test di Newman-Keuls (*)	Test di Bonferroni (**)
Xilanasi	Rispettate	0,00087	93%	Significativo	Significativo

Tabella 2: Analisi della varianza – studio dell'effetto del campionamento

* Test di Newman-Keuls: questo test di confronto delle medie consente di costituire dei gruppi omogenei di trattamenti: quelli appartenenti allo stesso gruppo sono considerati "non differenti" per l'errore di prima specie scelto.

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018

** Test di Bonferroni: chiamato anche "test del t corretto", il test di Bonferroni consente di realizzare tutti i confronti delle coppie di medie, cioè (t (t-1))/2 confronti tra i trattamenti, rispettando l'errore □ di prima specie scelto.

In questo modo, i test realizzati permettono di osservare una differenza, qualora esista realmente (potenza del test elevata); inoltre, il metodo di determinazione presenta una probabilità di comparsa dello scarto d'attività (tra i prelievi di campione) inferiore al 5%, rafforzata da un'appartenenza a uno stesso gruppo (test di Newman-Keuls non significativo) e considerata come "non diversa" per l'errore □ di prima specie (test di Bonferroni non significativo).

12. Riferimenti bibliografici

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, vol. 153, 1944, pagg. 375-380.
2. Doco, T., et al., "Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides", Carbohydrate Polymers, vol. 53, nº 3, 15 agosto 2003, pagg. 253-261.

Esemplare certificato conforme Punta del Este, 23 novembre 2018
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2018