RÉSOLUTION OIV-OENO 488-2013

REVISION DE LA MONOGRAPHIE SUR LA DETERMINATION DE L'ACTIVITE □-GLUCANASE (□ 1-3, □ 1-6) DANS LES PREPARATIONS ENZYMATIQUES (OIV-OENO 340-2010)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

AYANT PRIS CONNAISSANCE des travaux du groupe d'experts « Spécification des produits œnologiques »,

CONSIDÉRANT la résolution OIV-OENO 340/2010 adoptée par l'OIV,

DÉCIDE, sur proposition de la Commission II « Œnologie », de modifier la résolution OIV-OENO 340/2010 publiée dans le Codex Œnologique International conformément aux modifications suivantes :

Détermination de l'activitÉ □-glucanase (□ 1-3, □ 1-6) dans les prÉparations enzymatiques

Spécifications générales

Ces activités enzymatiques sont généralement présentes au sein d'une préparation enzymatique complexe. Dans la dégradation des ß-glucanes de *Botrytis cinerea*, des activités endo-ß-glucanase de type endo-ß-1,3 et exo-1,6 ß-glucosidase ainsi que des activités de type exo-ß-1,3 sont impliquées. Elles sont ici résumées sous le terme communément utilisé de ß-glucanases. Ces préparations enzymatiques sont également capables de dégrader les ß-glucanes dans la paroi cellulaire des cellules mourantes des levures *Saccharomyces*, ce qui contribue au processus appelé « élevage de vin sur lie ». Des activités endo-ß-1,3, endo-ß-1,6 ainsi que des activités exo ß-1,3, et exo-ß-1,6 sont impliquées dans ce processus. Sauf indication contraire, les spécifications doivent être conformes à la résolution Oeno 365-2009 relative aux spécifications générales des préparations enzymatiques incluse dans le Codex Œnologique International.

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

1. Origine

Il convient de se référer au paragraphe 5 « Sources d'enzymes et milieux de fermentation » de la monographie générale sur les préparations enzymatiques.

Les préparations enzymatiques contenant des activités ß-glucanases sont produites par fermentations directes, par exemple, de *Trichoderma harzianum, Trichoderma longibrachiatum* (*T. reesei*) et *Penicillium funiculosum* ».

2. Domaine d'application

Il convient de se référer au Code international des pratiques œnologiques, OENO 11/04; 12/04; 15/04 et 3/85.

Les préparations enzymatiques contenant des activités ß 1-3 et ß 1-6 glucanase sont capables d'hydrolyser le glucane produit par *Botrytis cinerea* (pourriture noble et pourriture grise). Ce polysaccharide pose des problèmes importants pendant les processus de clarification et de filtration. De telles ß-glucanases sont donc employées spécifiquement pour la clarification et la filtration des vins produits à partir de raisins botrytisés.

Les glucanes contenus dans les parois cellulaires des levures sont également hydrolysés par ces ß-glucanases. Elles peuvent être utilisées pour améliorer le processus de l'élevage sur lies ainsi que la filtrabilité.

3. Principe

La méthode d'analyse est basée sur le dosage du glucose libéré par l'enzyme, dont on veut mesurer l'activité, à partir d'une solution standardisée de glucane de *Schizophyllum* sp en tant que substrat.

3.1. Définition des unités

L'unité de □-glucanase (□-Glu-U) est définie comme la quantité de sucres réducteurs, exprimée en glucose, qui est libérée dans des conditions d'essai par 1 g (ou 1 ml) d'enzyme par minute.

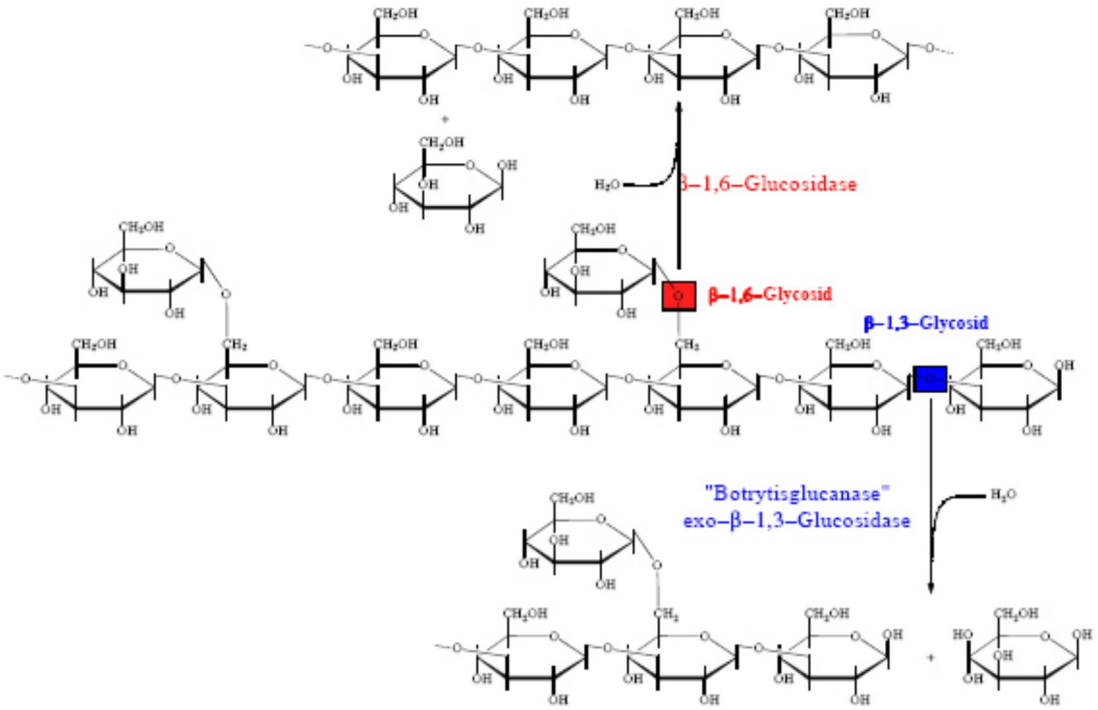
3.2. Rôle de l'enzyme

Botrytis cinerea excrète pendant sa croissance sur les raisins infectés (pourriture grise ou noble) un □-1,3-glucane qui possède à chaque troisième unité de glucose un résidu glycosilé de glucose en □-1,6 (Fig. 1). Ce glucane est très similaire à celui

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

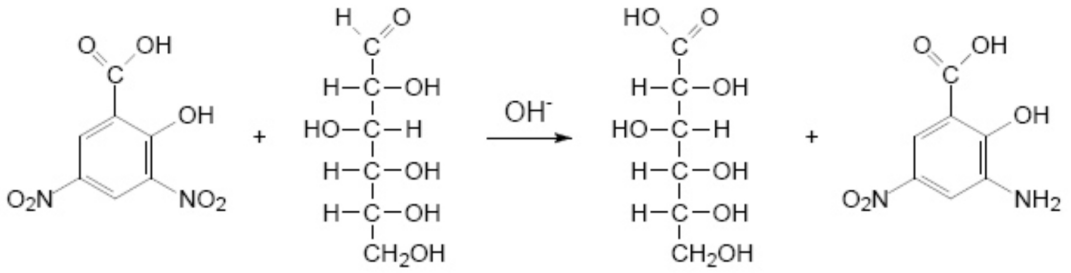
© OIV 2013

synthétisé par *Schizophyllum* sp.



3.3. Principe de la mesure

L'activité enzymatique libère du glucose qui, en solution basique, réduit l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique. Une addition de phénol augmente la sensibilité de la réaction. L'hydrogénosulfite de sodium sert à stabiliser la coloration.



Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

4. APPAREILLAGE

4.1. Spectrophotomètre et cuvettes de 1 cm de parcours optique
4.2. Bain d'eau 40°C, 100°C
4.3. Agitateur magnétique standard
4.4. Agitateur magnétique multipoint submersible, réglé à 300 rpm
4.5. Flacons de mesure (ballons jaugés, vases cylindriques, flacons coniques...)
4.6. Becher
4.7. Micropipettes
4.8. Chronomètre
4.9. Bain à ultrasons
4.10. pHmètre

5. Réactifs et produits

5.1. Substrat

Solution mère de glucane fournie par l'université de Braunschweig dont la teneur en glucane a été déterminée par l'université de Braunschweig[1]

5.2. Produits purs

5.2.1. Acide citrique monohydrate (N° CAS 5949-29-1)
5.2.2. Hydroxyde de sodium (N° CAS 1310-73-2)
5.2.3. Tartrate de sodium et de potassium (N° CAS 304-59-6)
5.2.4. Métabisulfite de sodium $Na_2O_5S_2$ (N° CAS 7681-57-4)
5.2.5. Phénol (N° CAS 108-95-2)
5.2.6. Glucose anhydre
5.2.7. Acide 3,5-dinitro-2-hydroxybenzoïque (3,5-dinitrosalicylique) (N° CAS 609-99-4)
5.2.8. Eau distillée

5.3. Solutions

5.3.1. Solution d'hydroxyde de sodium 1M

Dans un ballon jaugé de 100 ml dissoudre 4,0 g d'hydroxyde de sodium (5.2.2) avec de

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

l'eau distillée (5.2.8) et compléter au volume.

5.3.2. Solution tampon citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l

Dans un ballon jaugé de 500 ml, 21,0 g d'acide citrique monohydrate (5.2.1) sont dissous dans 400 ml d'eau distillée, puis le pH est ajusté à 4,0 avec une solution molaire d'hydroxyde de sodium (5.3.1) et le volume est complété avec de l'eau distillée (5.2.8).

5.3.3. Solution tampon citrate (pH 4,0), 0,1 mol/l

Dans un ballon jaugé de 1000 ml, 21,0 g d'acide citrique monohydrate (5.2.1) sont dissous dans 900 ml d'eau distillée (5.2.8), puis le pH est ajusté à 4,0 avec une solution molaire d'hydroxyde de sodium (5.3.1) et le volume est complété avec de l'eau distillée (5.2.8).

5.3.4. Solution de titrage : réactif de couleur acide DNS-(dinitrosalicylique) au phénol

Il est préparé à partir des solution A,B,C ci-dessous :

5.3.4.1. Solution A :

Peser 154,2 g de tartrate de sodium et de potassium (5.2.3) dans un vase cylindrique de 800 ml et dissoudre complètement dans 500 ml d'eau distillée (5.2.8). Ajouter 9,7 g d'hydroxyde de sodium (5.2.2).

5.3.4.2. Solution B :

Dans un vase cylindrique de 2000 ml dissoudre complètement 5,3 g d'acide de 3,5-dinitrosalicylique (5.2.7) dans 500 ml d'eau distillée (5.2.8). Les meilleurs résultats sont réalisés en utilisant le bain à ultrasons.

5.3.4.3. Solution C :

Dans un vase cylindrique de 100 ml dissoudre 4,2 g de phénol (5.2.5) dans 50 ml d'eau distillée (5.2.8). Ajouter ensuite 1g d'hydroxyde du sodium (5.2.2) et après la dissolution complète, 4,2 g. bisulfite de sodium (5.2.4) et dissoudre de nouveau.

5.3.4.4. Solution de glucose à 0,3 %

Dans un ballon jaugé de 100 ml placer exactement 300 mg de glucose (5.2.6) dissoudre dans de l'eau distillée (5.2.8) puis compléter au volume avec de l'eau distillée.

5.3.4.5. Réactif DNS-couleur au phénol

Les solutions A et C sont mélangées à la solution B dans un vase cylindrique de 2000

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

ml qui est ensuite couvert avec du papier d'aluminium.

Avant l'emploi, conserver à l'obscurité pendant au moins 3 jours.

Transvaser le réactif dans un flacon en verre brun.

Entreposé dans un endroit sombre et à une température de 15-20 °C ; la solution peut être utilisée pendant un mois.

Pour chaque réactif nouvellement préparé et avant chaque mesure, un nouveau calibrage est effectué avant chaque analyse de l'enzyme.

Avant chaque utilisation, 3 ml d'une solution de glucose à 0,3 % (5.3.3.4), doivent être ajoutés à 200 ml du réactif DNS-couleur au phénol.

5.3.5. Glucane en solution à 0,1%, pH 4,0

Peser la quantité exacte de solution mère de glucane (5.1), pour obtenir une concentration finale de 1 g /l.

La solution finale de substrat doit contenir 50% de la solution tampon de citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l (5.3.2).

Pour obtenir 100 ml de la solution de substrat à partir de la solution mère de glucane (5.1) (contenant réellement 5.2 g/l), 19,2 g sont pesés dans un vase cylindrique de 100 ml. 50 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0), 0,2 mol/l (5.3.2), sont ajoutés. Réaliser une solution homogène de glucane en remuant pendant au moins 15 minutes. La solution bien homogénéisée est ajustée à pH 4,0 avec une solution molaire de hydroxyde de sodium (5.3.1). La solution est transférée dans un ballon jaugé de 100 ml et plus tard complétée au volume avec de l'eau distillée (5.2.8).

Chaque solution mère de glucane est stockée à la température ambiante. Si une nouvelle solution mère de glucane est employée, un facteur de substrat de glucane (Gf = facteur de glucane) doit être déterminé au moyen de l'enzyme standard. Le facteur "Gf" de glucane est indispensable pour comparer des résultats des solutions mères précédentes de glucane aux nouvelles. Le facteur "Gf" de glucane est calculé avec les valeurs mesurées en considérant que l'activité enzymatique standard est de 10000 □□Glu U/g dans la formule (voir : Calcul de l'activité enzymatique).

5.4. Préparations enzymatiques

5.4.1. Solution Standard d'enzymes Glucanase :

0,5 g de préparation enzymatique Standard de Glucanase est dissoute dans 25 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0 ; 0,1 mol/l) (5.3.3) et complétée au volume de 100 ml avec de l'eau distillée (5.2.8).

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

5.4.2. Pour toutes les autres préparations enzymatiques :

1 ml de préparation enzymatique ou 0,5 g de préparation enzymatique solide en poudre ou en granulés sont dissoutes dans 25 ml de la solution tampon de citrate (pH 4,0 ; 0,1 mol/l) (5.3.3) et complété au volume de 100 ml avec de l'eau distillée (5.2.8). Si les valeurs d'absorption sont trop hautes ou trop basses (plage d'absorbance 0.1-0.6), une dilution appropriée est nécessaire. La dilution d'enzymes doit contenir 25 % de solution tampon citrate (5.3.3).

6. Mode opératoire

6.1. Essai à blanc du réactif

Ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4) à 3 ml d'eau distillée (5.2.8) dans un ballon jaugé de 50 ml et les chauffer pendant exactement 10 minutes sur un bain d'eau bouillante. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau de 20°C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20°C, compléter au volume.

6.2. Courbe d'étalonnage du glucose avec réactif DNS-couleur au phénol

Dissoudre 2,00 g de glucose (5.2.6) de dans un ballon jaugé de 200 ml et compléter au volume avec de l'eau distillée (5.2.8). À partir de cette solution courante, préparer les dilutions comme suit :

N°	V solution courante / 100 ml	glucose/100 ml	glucose (µg) dans l'essai (= 0,5 ml)
1	2 ml	20 mg	100 µg
2	5 ml	50 mg	250 µg
3	10 ml	100 mg	500 µg
4	15 ml	150 mg	750 µg
5	20 ml	200 mg	1,000 µg
6	30 ml	300 mg	1,500 µg

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

7	40 ml	400 mg	2,000 µg

Introduire à la pipette 0,5 ml de chaque dilution de glucose dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4) et 2,5 ml d'eau distillée (5.2.8). Chauffer les récipients de mesure pendant exactement 10 minutes dans un bain d'eau bouillante. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau à 20 °C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20 °C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).

Porter dans un diagramme la quantité de glucose libérée dans l'essai contre l'absorption à 515 nm (Fig. 2).

La courbe d'étalonnage est exécutée le même jour avant chaque analyse de l'enzyme.

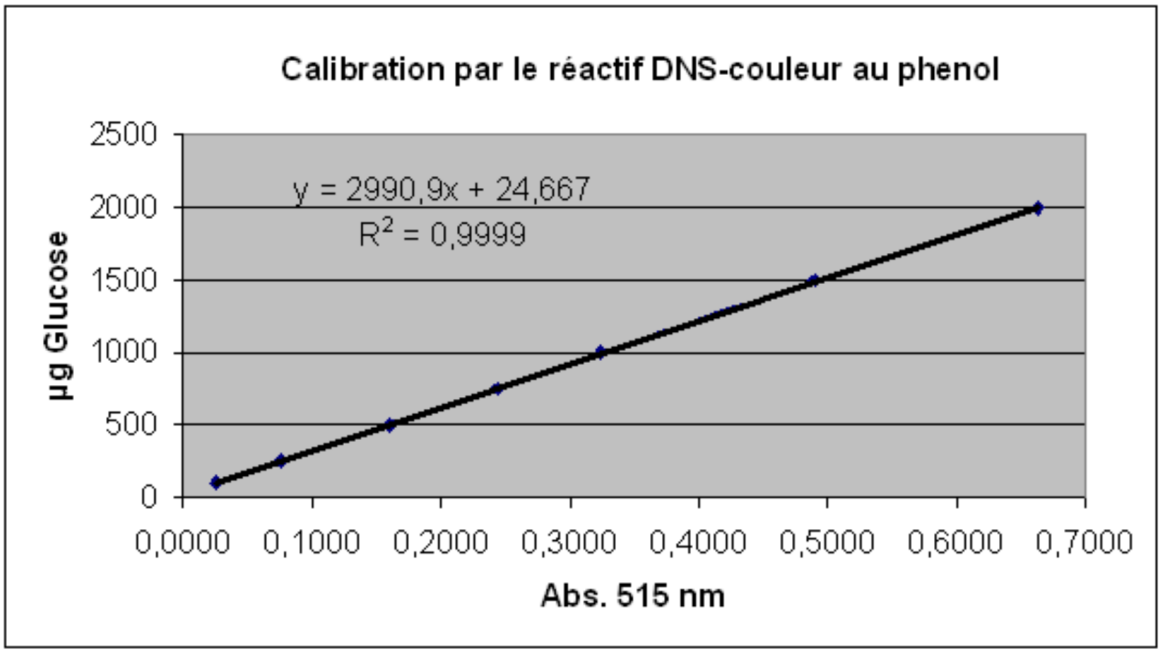


Figure 2

6.3. Essai à blanc des enzymes

Introduire à la pipette 0,5 ml de chaque solution d'enzymes (5.4.1 ou 5.4.2) dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4).

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

Mélanger soigneusement et ajouter 2,5 ml de la solution de substrat (5.3.5). Bien mélanger par agitation manuelle. Ensuite chauffer tous les échantillons sur un bain d'eau bouillante pendant exactement 10 minutes. Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau de 20°C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge. Après 10 minutes à 20°C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).

6.4. Mesure de l'activité des préparations enzymatiques

Pour chaque échantillon d'enzymes, 10 ml de substrat (5.3.5) sont placés dans une fiole conique durant 5 minutes dans un bain d'eau à 40 °C. Les échantillons doivent être homogénéisés à l'aide d'un agitateur magnétique multipoint submersible réglé à 300 rpm.

Après 5 minutes, 2 ml de la solution d'enzymes (5.4.1 ou 5.4.2) sont ajoutés dans le premier échantillon et un chronomètre est démarré juste après l'addition de la première solution d'enzymes.

Ajouter ensuite les solutions d'enzymes suivantes à tous les autres échantillons avec décalage de 30 secondes pour chaque échantillon.

Les échantillons doivent être agités ensuite à 300 rpm durant tout le temps de réaction.

Après exactement 15 minutes prélever 3 ml du premier mélange, suivis de tous autres échantillons avec un décalage de 30 secondes.

Chaque mélange de 3 ml est introduit à la pipette dans un nombre correspondant de ballons jaugés de 50 ml, contenant chacun 7 ml de réactif DNS-couleur au phénol (5.3.4).

Ensuite chauffer tous les échantillons sur un bain d'eau bouillante pendant exactement 10 minutes en respectant le décalage de 30 secondes entre les échantillons.

Refroidir ensuite pendant 5 minutes dans un bain de glace, puis transférer le ballon dans un bain d'eau à 20 °C et ajouter de l'eau distillée (5.2.8) sans tout à fait atteindre le trait de jauge.

Après 10 minutes à 20°C compléter au volume. Mesurer l'absorbance des solutions au spectrophotomètre dans les 15 minutes suivantes, à la longueur d'onde de 515 nm contre le blanc (réactif seul).

La différence d'absorption entre la lecture à blanc d'enzymes et la valeur après

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

réaction doit être comprise entre 0,1 et 0,6 unité d'absorbance.

Si les valeurs sont au delà de la gamme de mesure de la courbe d'étalonnage, répéter l'essai avec des dilutions adaptées des enzymes.

Avec toutes les enzymes, préparer toujours 1 lecture à blanc de l'enzyme et 2 valeurs après réaction. Les deux valeurs après réactions doivent être proches.

7. CALCULS

Pour le calcul de l'activité utiliser la valeur moyenne des deux mesures.

L'activité enzymatique d'une préparation enzymatique est calculée selon la formule suivante.

- Activité β-Glu-Unité/g ou ml = (G X 200)/(15 x E) X 1/Gf
- Nkat/g ou ml = (Activité β-Glu-Unité/g ou ml) X (1000/60)

G = quantité de sucres réducteurs libérés dans l'essai (sucres réducteurs libérés par Δ = moyenne de 2 répétitions de l'absorbance après réaction – l'absorbance de l'enzyme blanc, calculée en glucose à partir de la courbe de calibration du glucose en µg).

E = quantité d'enzyme diluée à 100 ml en g ou ml

200 = facteur de dilution

15 = temps de réaction en min

Gf = facteur de glucane (à calculer)

Exemple de calcul :

enzyme	Valeur mesurée 1	2	Enzyme Blanc	E	µg glucose	Unités ß-Glu/gou ml
Enzyme Utilisée	0,621	0,618	0,415	0,503	662	10325
Penicillium funiculosum ß-Glucanase	0,417	0,416	0,023	1	1249	9799

Calcul du Gf :

1 réaliser la mesure avec l'ancien substrat et l'enzyme standard (Valeur 1)

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013

2 réaliser la mesure avec le nouveau substrat et l'enzyme standard (valeur 2)
Calcul : valeur 1 / Valeur 2

8. BIBLIOGRAPHIE

1. Bertrand A. Détermination de l'activité β-glucanase de *Botrytis* des préparations enzymatiques OIV FV 1263.

---

[1] Prof. Dr. Udo Rau, Technical University Braunschweig, Department of Biochemistry and Biotechnology Spielmannstr. 7, 38106 Braunschweig - Allemagne

Exemplaire certifié conforme Budapest, 7 juin 2013
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2013