

RÉSOLUTION OIV-OENO 452-2012

MONOGRAPHIE SUR LES EXTRAITS PROTEIQUES DE LEVURES (EPL)

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,

CONSIDÉRANT les travaux du groupe d'experts « Spécifications des produits œnologiques »

CONSIDÉRANT les résolutions OENO 416-2011 et OENO 417-2011 autorisant les extraits protéiques de levures comme nouveaux traitements œnologiques pour les moûts et les vins,

DECIDE de compléter le « Codex œnologique international » par la monographie suivante :

EXTRAITS PROTEIQUES LEVURIENS (EPL)

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les protéines des extraits protéiques de levures proviennent majoritairement du cytoplasme de la levure *Saccharomyces sp.* Elles sont séparées par des méthodes physiques après un procédé d'extraction qui limite leur hydrolyse.

Les protéines des extraits protéiques de levures présentent des masses moléculaires et des charges électriques variables en fonction de leur mode d'obtention. Elles sont capables de flocculer dans les moûts et les vins pour permettre leur clarification et leur stabilisation colloïdale (opérations de collage).

Lorsque les extraits protéiques de levures proviennent de levures œnologiques génétiquement modifiées, celles-ci doivent avoir été soumises à l'autorisation préalable des autorités compétentes.

2. ETIQUETAGE

L'étiquette doit indiquer

- Le domaine d'application (collage des moûts et des vins)
- Les conditions de sécurité et de conservation ainsi que la date limite d'utilisation.

- Les additifs éventuels
- n° du lot de fabrication

L'indication si les extraits protéiques proviennent de levures obtenues par modification génétiques ainsi que le caractère modifié si c'est le cas

3. CARACTERISATION

3.1. Les EPL se présentent sous une forme de poudre, généralement micro-granulée, de couleur jaune claire à beige ou beige, avec une légère odeur de levure.

3.2. Les EPL sont solubles dans l'eau et insolubles dans l'éthanol.

En solution aqueuse, elles précipitent quand on rajoute 1 volume d'éthanol.

3.3. Dosages des protéines

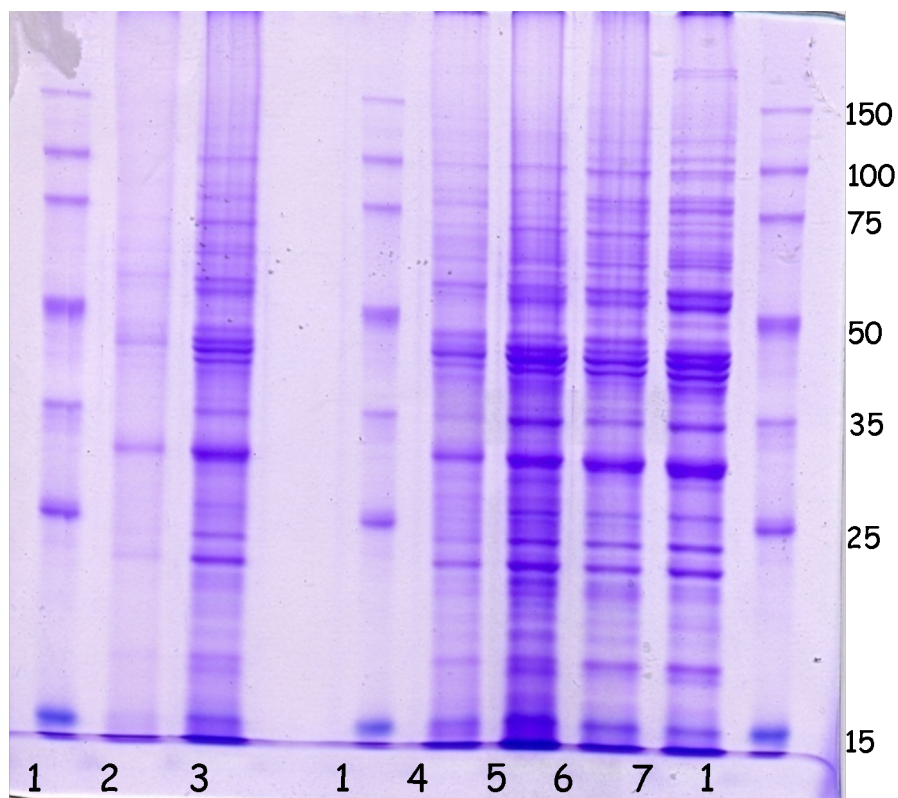
3.3.1. Protéines totales

Le dosage des protéines peut se faire par la méthode de Lowry décrite dans l'annexe 1
La teneur en protéines totales des EPL doit être supérieure à 50% du produit sec

3.3.2. taille des protéines

L'évaluation de la taille ou des poids moléculaires des protéines est réalisée par la technique de séparation par électrophorèse SDS-PAGE décrite en annexe 3

Exemple de différents profils d'extraits protéiques de levures avec coloration au bleu de Coomassie :



- 1: Marqueur de taille
- 2: Souche 1 Phase Exponentielle
- 3: Souche 1 Phase Stationnaire
- 4: Souche 2 Phase Exponentielle
- 5: Souche 2 Phase Stationnaire
- 6: Souche 3 Phase Exponentielle (Souche dépourvue de protéase A)
- 7: Souche 3 Phase Stationnaire (Souche dépourvue de protéase A)

3.3.3. taux de protéines supérieur à 15 KDa

Ce taux est estimé au moyen de la technique de perméation sur gel décrite en annexe 4

Au moins 50% des protéines totales doivent avoir des poids moléculaires supérieurs à 15 KDa

3.4. Azote aminé

La teneur en azote aminé exprimée en glycine représente 10 à 20% maximum du produit sec

- Le dosage de l'azote aminé pourra être fait par la Méthode du Dinitrofluorobenzène (DNFB) décrite en annexe 2

4. ESSAIS

4.1. Perte à la dessiccation

Mettre 5 g d'EPL dans une capsule de silice de 70 mm de diamètre. Placer dans une étuve à 100-105 °C pendant 5 heures. La perte de poids ne doit pas être supérieure à 15 p.100.

Les limites fixées ci-dessous sont rapportées au produit sec.

4.2. Cendres

Incinérer le résidu sec à 550-600 °C. La teneur en cendres ne doit pas être supérieure à 8%.

4.3. Préparation de la solution pour essai

Préparer une solution d'EPL à 10 g/l dans l'eau.

4.4. Plomb

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser le plomb selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en plomb doit être inférieure à 2 mg/kg.

4.5. Mercure

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) mais sans évaporer la solution doser le mercure selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en mercure doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.6. Arsenic

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser l'arsenic selon la méthode décrite au

chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en arsenic doit être inférieure à 3 mg/kg.

4.7. Cadmium

Sur la solution préparée pour l'essai (4.3) doser le cadmium selon la méthode décrite au chapitre II du Codex Oenologique International

La teneur en cadmium doit être inférieure à 1 mg/kg.

4.8. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

4.8.1. Flore mésophile aérobie totale

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Oenologique international.

Il faut moins de 10 000 germes totaux aérobies mésophiles dans 1 g.

4.8.2. Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Oenologique international.

Il faut moins de 10 UFC/g de préparation.

4.8.3. Staphylococcus

Procéder au dénombrement selon une méthode à décrire au Chapitre II du Codex Oenologique international.

Absence contrôlée de *Staphylococcus aureus* sur un échantillon de 1 g.

4.8.4. Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Oenologique international.

Absence contrôlée de salmonelles sur un échantillon de 25 g.

4.8.5. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Oenologique international.

Absence contrôlée d'*Escherichia coli* sur un échantillon de 25 g.

4.8.6. Bactéries lactiques

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex

Œnologique international.

Il faut moins de 10^3 UFC/g de préparation

4.8.7. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 50 UFC/g de préparation

4.8.8. Levures

Procéder au dénombrement selon la méthode décrite au Chapitre II du Codex Œnologique international.

Il faut moins de 10^2 UFC/g de préparation

4.9. TEST D'EFFICACITE DES EPL POUR LE COLLAGE DES MOÛTS ET DES VINS

4.9.1. Principe

Il s'agit de déterminer la dose la plus compatible pour obtenir une clarification rapide et une stabilité colloïdale du vin.

4.9.2. Produit :

Moûts ou vins à coller

4.9.3. Protocole :

4.9.3.1. Solution de EPL à 2%

Dissoudre 2 g de EPL dans 100 ml d'eau distillée.

4.9.4. Test de collage

Placer 100 ml de moût ou de vin dans autant de tubes de 100 ml que de dosages retenus. En pratique, la comparaison de 4 doses est suffisante. Soit 5 tubes de 100 ml dont le témoin.

Ajouter 0 (témoin), 1, 5 ml, 2ml, 2,5 ml de la solution de EPL(4.9.3.1) pour un vin rouge et 0,5ml, 1ml, 1,5 ml de la solution de EPL pour un moût blanc ou rosé ou un vin blanc ou rosé. Ces quantités correspondent respectivement à des doses finales de 0, 200 mg/l, 300mg/l, 400 mg/l, 500mg/l pour un vin rouge et de 0, 100 mg/l, 200 mg/l, 300mg/l pour un moût blanc ou rosé ou un vin blanc ou rosé

- Homogénéiser chaque tube juste après introduction de la solution d'EPL (2-3

retournements manuels des tubes protégés par un film. Observer, la vitesse d'augmentation de turbidité, d'apparition des flocons toutes les 10 mn pendant 30 mn puis après 8 heures comparer entre chaque essai et contrôler :

- La turbidité,
- Le volume de lies,
- Les intensités colorantes,
- La qualité organoleptique
- La stabilité colloïdale par un passage à 80°C pendant 20mn dans un bain-d'eau ou une étuve à 100 °C et un refroidissement rapide sous un courant d'eau froide.

5. CONSERVATION

Les Extraits protéiques de levures ont une durée de conservation de 3 ans en emballage non ouvert, stockés dans des locaux tempérés à l'abri de l'humidité..

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Feuillat M. (1986). Autolysats de levures à usage oenologique et leur procédé de fabrication. France.
2. Feuillat M. (1987). "Préparation d'autolysats de levures et addition dans les vins effervescents élaborés selon la méthode champenoise." Rev. Fr. Oeno **109**: 17-27.
3. Charpentier C. and Feuillat M. (1992). Yeast autolysis. Wine microbiology and biotechnology. F. G.H. Chur, Harwood Academic Publisher.
4. Charpentier C. and Freyssinet M. (1989). "The mechanism of yeast autolysis in wine." Yeast: S1 S48.
5. Charpentier C. (2000). "Yeast autolysis and yeast macromolecules? Their contribution to wine flavor and stability." Am. J. Enol.Vitic. **51**: 271-277.
6. Charpentier C., Caillet M.M, Feuillat M. (2006) Essais de collage de moûts blancs et de vins rouges avec un extrait protéique levurien : comparaison avec les colles traditionnelles. Rev. Œnologues 120, juillet 2006.

Annexe 1

1. Méthode Lowry

2. Introduction

La méthode proposée est celle de LOWRY (LOWRY et al. 1951) mais elle peut être remplacée par d'autres méthodes par exemple celle de BRADFORD (1976). Bradford, M. M. (1976) *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal. Biochem. 72:248-254.

3. Domaine d'application

La méthode de LOWRY est une méthode dérivée de celle du Biuret : en milieu alcalin, les ions cuivre forment avec les protéines un complexe cuivrique violet-rose caractéristique des liaisons peptidiques. Elle est 100 fois plus sensible que celle du Biuret.

4. Définition

La méthode de LOWRY consiste à complexer par le cuivre, en milieu alcalin, environ un quart des acides aminés constituant les protéines. Le réactif de Folin Ciocalteu (réactif phosphomolybdique) réagit avec les acides aminés aromatiques des protéines. L'absorbance du complexe formé est déterminée par spectrophotométrie à 750 nm. Le principal inconvénient de cette méthode est l'interférence du réactif de Folin avec d'autres composés (EDTA, dithioérythritol, glutathion oxydé...)

Le dosage des protéines hydrosolubles se fait par comparaison avec une courbe-étalon établie à partir de solutions de protéines de concentration connue. (type BSA)

5. Réactifs et produits

- Solution A : solution de Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 M contenant du tartrate de sodium (ou de potassium) 0,02% (500 ml).
- Solution B : solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 5% (100 ml).
- Réactif C : à réaliser extemporanément. 50 ml de solution A + 1 ml de solution B.

- Réactif de FOLIN-CIOCALTEU : solution commerciale.
- Solution de sérum albumine bovine standard (BSA)

6. Appareillage

- Tubes à essais
- Pipettes classe A
- Micropipettes
- film étirable pour obturation
- Spectrophotomètre Visible

7. Mode opératoire

7.1. Gamme-étalon de protéines : préparation et dosage

La gamme-étalon est effectuée à partir d'une solution standard de BSA à 0,5 mg.ml⁻¹.

- Dans des fioles jaugées de 100 ml préparer des solutions de BSA contenant 0,100, 200, 300 et 400 µg.ml⁻¹ de BSA à partir de la solution mère
- Répartir dans des tubes à essais 0,6 ml de chacune des dilutions. Un tube témoin contiendra uniquement 0,6 ml d'eau distillée

Bien homogénéiser par renversement chaque solution.

- Ajouter dans chaque tube :
- 3 ml de réactif C
- Fermer le tube à l'aide du film étirable et homogénéiser par retournement.
- Laisser reposer 10 minutes avant d'ajouter 0,3 ml de réactif de FOLIN.
- Homogénéiser.
- Attendre 30 minutes à l'obscurité puis mesurer l'absorbance à 750 nm en

réglant le zéro avec la solution 'eau distillée' (concentration en BSA 0 $\mu\text{g. ml}^{-1}$).

- Tracer la courbe D.O. = f(concentration en protéines).

7.2. Dosage des protéines de l'Extrait Protéique de Levures

- Dans 3 tubes à essais ajouter successivement :
 - 0,6 ml d'extrait dilué au 1/20^e, 1/30^e et 1/40^e (soit 30, 20 et 15 μl dans 0,6 ml)
 - 3 ml de réactif C ; homogénéiser après obturation des tubes et laisser reposer 10 minutes
 - 0,3 ml de réactif de FOLIN, Homogénéiser.
 - Attendre 30 minutes à l'obscurité
 - Mesurer l'absorbance. à 750 nm.

8. Calculs

- Remarque : si les valeurs de l'absorbance sont faibles, recommencer en effectuant des dilutions moins importantes de l'extrait protéique de levures (1/10^e, 1/5^e, 1/4^e soit 60, 120 et 150 μl dans 0,6ml).
- Déterminer par rapport à la courbe-étalon la concentration en protéines de l'EPL en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ puis en mg.ml^{-1} . par lecture directe ou en utilisant la droite de régression de la courbe-étalon (préciser sur la courbe-étalon l'équation de cette droite et le coefficient de corrélation).

Annexe 2

1. Méthode au Dinitrofluorobenzène

2. Introduction

Cette méthode permet de doser rapidement l'azote aminé dans une solution

biologique par rapport à une gamme étalon réalisée avec une solution de glycine.

3. Domaine d'application

Produits œnologiques d'origine végétale ou animale

4. Définition

Le Dinitrofluorobenzène ou DNNFB réagit avec les fonctions NH_2 libres contenues dans les acides aminés pour donner un composé de couleur jaune vif dosé par colorimétrie à 420 nm. La réaction s'effectue à un $\text{pH} > 9,3$.

5. Réactifs et produits

Réactifs :

- *Borax ou Tétraborate de sodium*
- *Dinitrofluorobenzène Acide chlorhydrique 10 M*
- *Glycine*

6. Appareillage

- Tubes à hémolyse
- Micropipettes
- Spectrophotomètre visible
- Bain d'eau à 60 °C

7. Echantillonnage

- Préparer une solution de tétraborate de sodium à 5% dans de l'eau pure
- Préparer une solution au DNFB : introduire 130 μl de DNFB dans 10 ml d'éthanol pur à 95 % vol.

- Préparer une solution d'acide chlorhydrique 2M
- Réaliser une gamme étalon à partir d'une solution mère de glycine à 2 g/l (M=75,07 g) par ex 0 , 50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l
- Préparer une solution à 2 g/l du produit à doser

8. Mode opératoire

- Dans un tube à hémolyse introduire :
 - 380 µl de Borax à 5%
 - 20 µl de l'échantillon à doser
 - 20 µl de solution au DNFB procéder à l'identique pour la gamme de glycine
 - Agiter et placer au bain d'eau à 60 °C pendant 30 min
 - Ajouter 3 ml de HCL 2M
 - Agiter et lire l'absorbance spécifique à 420 nm pour l'échantillon
 - Réaliser une droite étalon avec la gamme de Glycine

9. Résultats

Reporter la valeur de l'absorbance à 420 nm de l'échantillon sur la droite étalon
Les résultats sont exprimés en g/l de Glycine

Annexe 3

Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

1. INTRODUCTION

L'électrophorèse SDS-PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) est une variante d'électrophorèse couramment utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur

poids moléculaire

2. Domaine d'application

Évaluation des poids moléculaires des protéines d'origine végétale ou animale. Cette méthode peut s'appliquer à tous les produits d'origine biologique et aux produits œnologiques contenant des protéines.

3. Principe

La détermination des poids moléculaires des protéines est réalisée par électrophorèse SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (1970). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire grâce au S-dodécyl sulfate ou SDS, molécule très fortement chargée négativement qui uniformise leurs charges et leur font perdre leur structure tridimensionnelle native. La vitesse de migration de l'ensemble de la molécule dénaturée/SDS dépend uniquement du poids moléculaire des protéines. Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, les ponts disulfures des protéines doivent être réduits par le 2-Mercaptoéthanol.

Le milieu de migration est constitué d'un gel de Poly-Acrylamide.

Le gel est composé de deux parties. Un gel de concentration qui, comme son nom l'indique, permet aux protéines de se concentrer avant leur migration dans le gel de séparation situé en dessous

Le gel de concentration contient 5 % d'acrylamide-bisacrylamide, tandis que le gel de séparation en contient 12 %.

La migration se fait dans du tampon d'électrophorèse réfrigéré à 12°C et sous agitation pendant environ 1 h 30 sous une tension de 80 V pour le gel de concentration, puis pendant près de 3 h à 170 V pour le gel de séparation.

Le gel une fois démoulé subit une coloration pour révéler les bandes de protéines. Les poids moléculaires de ces dernières peuvent être mesurés à l'aide de marqueurs de taille connus ayant migré avec les échantillons. Par exemple à l'aide d'un marqueur commercialisé par Sigma sous le nom *Molecular Weight Standard Mixture* avec les tailles suivantes : 15, 25, 35, 50, 75, 100 et 150 Kda.

4. Réactifs et produits

4.1. Tampon de dénaturation :

- Tampon Tris Hcl 0,125 M pH 6,8
- Eau distillée
- SDS à 4%
- 2 mercaptoéthanol à 10%;
- Bleu de bromophénol à 0,2%
- Glycérol pur
- Eau distillée QSP

4.2. Gel de séparation, préparation pour 30 ml

- 7,50 mL d'acrylamide bis acrylamide
- 11,25 mL de tampon Tris/Hcl à 0,75 M pH 8,8
- 0,30 mL de SDS à 10%
- 10,95 mL d'eau distillée
- 30 microlitres de TEMED pour la polymérisation
- après agitation, ajouter 300 microlitres de persulfate d'ammonium à 20%

4.3. Gel de concentration, préparation pour 10 ml

- 1,25 mL d'acrylamide bis acrylamide
- 1,25 mL de tampon Tris/Hcl à 0,25 M pH 6,8
- 0,10 mL de SDS à 10%
- 7,4 mL d'eau distillée
- Pour la polymérisation ajouter 40 microlitres de TEMED
- Après agitation, ajouter 100 microlitres de persulfate d'ammonium à 20%

4.4. Tampon de migration, préparation pour 1 litre

- 12,5 mL de Tampon Tris 25mM pH 8,3
- 14,4 g de glycine
- 977,5 mL d'eau distillée
- 10 mL SDS 10%

5. Appareillage

Le matériel d'électrophorèse

- Des plaques
- Des pinces
- Le joint d'étanchéité
- Le peigne
- Les espaceurs

6. Echantillonnage

6.1. Dénaturation des protéines des produits

- Les échantillons sont traités dans du tampon de dénaturation, préparé juste avant l'opération de dénaturation.
- 50 microlitres d'échantillons sont mélangés avec 50 microlitres de tampon dénaturant.
- L'ensemble est ensuite chauffé à ébullition pendant 4 minutes afin de favoriser la dénaturation des protéines.

7. Mode Opératoire

7.1. Préparation des plaques

- Les plaques d'électrophorèse sont nettoyées avant utilisation avec de l'eau (éventuellement savonneuse) puis avec de l'alcool à 70%.
- Essuyer les plaques avec un papier, sans laisser de fibres sur les faces où sera coulé le gel.
- Le joint d'étanchéité sur la plaque à bords rond.
- Mettre en place des espaceurs et la deuxième plaque en verre.
- L'ensemble est ensuite consolidé à l'aide des pinces.

7.2. Coulage du gel de séparation

- Le gel de séparation dès sa préparation, est coulé entre les 2 plaques à l'aide d'une pipette.
- Afin d'éviter la présence de bulle dans le gel, le montage est incliné lors du remplissage.
- Le gel est ensuite recouvert d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale.

7.3. Coulage du gel de concentration

- Retirer l'eau distillée du dessus du gel de séparation
- Remplir le montage avec le gel de concentration jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre en le maintenant incliné.
- Mettre le peigne en place pour former des puits dans le gel de concentration.

7.4. Dépôts des échantillons

- Retirer le peigne
- Placer les plaques et les cuves de migration dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir les cuves avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure.
- Déposer 50 microlitres d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue et selon la technique sous- marine.
- Déposer également un marqueur de taille chacun des puits se situant vers les bords afin d'encadrer les puits contenant les échantillons.
- Une fois les dépôts réalisés, la migration est lancée assez rapidement pour éviter la diffusion des dépôts

7.5. Lancement et arrêt de l'électrophorèse

- La durée de l'électrophorèse dépend de plusieurs facteurs : le
- Générateur utilisé, l'épaisseur du gel, la quantité de tampon utilisée, sa
- Dilution...
- Fermer le couvercle de la cuve
- Vérifier que le générateur est éteint ou hors tension
- Connecter les fils du couvercle au générateur
- Maintenir la température à 12°C
- Brancher le générateur au secteur
- Mettre le générateur en marche sur le voltage choisi : 80 volts pendant 1h30 pour le gel de concentration puis 170 volts pendant environ 3h pour la migration dans le gel de séparation
- Arrêt de l'électrophorèse jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.
- Eteindre le générateur et le déconnecter du courant
- Débrancher les fils du couvercle

- Ouvrir la cuve d'électrophorèse
- Sortir le gel sur son support

8. Résultats

Les bandes perpendiculaires au trajet de migration correspondant à chaque molécule de protéines peuvent être révélées par plusieurs types de coloration. L'intensité et l'épaisseur des bandes dépendent de la concentration en protéine.

Le marqueur de taille permet d'apprécier directement le poids moléculaire des protéines pour chaque bande.

8.1. Coloration des gels d'électrophorèse

Plusieurs types de coloration peuvent être appliqués afin de caractériser le plus précisément possible les protéines présentes.

Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, les gels d'électrophorèse sont immergés dans une solution de coloration au bleu de Coomassie (0,025 % de Bleu de Coomassie R250, 40 % de Méthanol, 7 % d'acide acétique) pendant une nuit.

Le lendemain les gels d'électrophorèse sont plongés pendant 30 min dans un premier bain de décoloration (40 % de méthanol, 7 % d'acide acétique) pour enlever l'excès de colorant. Puis ils sont déposés dans un second bain (5 % de méthanol, 7 % d'acide acétique) qui est changé régulièrement jusqu'à obtention d'un fond presque incolore. Les étapes de coloration et décoloration sont réalisées sous agitation à température ambiante.

Les gels sont conservés dans de l'eau distillée avant d'être scannés pour analyses.

Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet de détecter des quantités de protéines plus faibles que la coloration au bleu de Coomassie. Les produits utilisés pour cette coloration sont fournis par *Biorad* et font partie du kit *Silver Stain Plus*.

L'électrophorèse une fois terminée, le gel est placé dans un bain de 400 ml de solution de fixation (50 % de méthanol, 10 % d'acide acétique, 10 % de fixative enhancer concentrate (kit), 30 % d'eau distillé) pendant 20 min sous agitation à température ambiante.

Le gel est ensuite rincé deux fois avec 400 ml d'eau distillé pendant 10 min dans le but d'éliminer l'acide acétique néfaste à l'étape de coloration.

La coloration est réalisée avec 100 ml d'une solution préparée comme indiqué ci-dessous :

Dans un grand bécher déposer :

- 35 ml d'eau distillée
- 5 ml de solution « Silver Complexe »
- 5 ml de solution « Reduction Moderator »
- 5 ml de réactif « Image developement »

Une fois ces produits bien mélangés et juste avant utilisation, 50 ml de solution « Developement Accelerator », à température de la pièce, sont additionnés au bécher. La préparation est alors versée sur le gel dans le bac de coloration. Après une durée de 20 à 60 min, en fonction de l'échantillon et de sa concentration, des bandes brunâtres apparaissent.

La réaction est alors stoppée par une solution d'acide acétique à 5 % pendant au moins 15 min, puis le gel est déposé environ 5 min dans de l'eau ultrapure. Les gels sont alors prêts à être scannés pour déterminer les poids moléculaires des bandes de protéines.

Coloration des glycoprotéines

Cette méthode est réalisée afin d'exprimer la présence de glycoprotéines dans les produits levuriens. Elle est réalisée à l'aide du Kit « GelCode® Glycoprotein Staining » commercialisé par la société Pierce Biotechnology.

Après électrophorèse, le gel est fixé par immersion complète dans un bain de 300 ml de méthanol à 50 % pendant 30 min sous agitation.

Laver le gel dans un bain contenant 300 ml d'acide acétique à 3% pendant 10 min. Renouveler cette étape une fois. (La coloration peut être stoppée après cette étape dans de l'eau distillée toute une nuit).

Le gel est ensuite recouvert de 25 ml de « Oxydizing Solution » sous agitation pendant 15 min.

Le gel est alors lavé 3 fois avec 300 ml d'acide acétique à 3 % pendant 5 min.

Une solution de 25 ml de GelCode® Glycoprotein Staining est déposée sur le gel pendant 15 min sous agitation.

Déposer 25 ml de « Reducing Solution » sous agitation douce pendant 5 min.

Laver le gel abondamment avec une solution d'acide acétique à 3 %. Les

glycoprotéines apparaissent sous forme de bandes magenta. Le gel peut être conservé dans une solution d'acide acétique à 3 % avant d'être scanné.

Annexe 4

Chromatographie de perméation de gel

1. Introduction

La méthode proposée est une technique de séparation des molécules. Ce type de chromatographie est aussi appelé tamisage moléculaire ou chromatographie d'exclusion.

2. Domaine d'application

Le profil des polymères sont étudiés dans les produits biologiques par chromatographie de perméation de gel sur une colonne optimisée pour l'analyse des protéines. Une double détection 280nm/214 nm permet de suivre l'élution de molécules contenant des acides aminés avec noyaux aromatiques et les liaisons peptidiques.

3. Définition

La chromatographie de perméation de gel permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme à l'aide d'une colonne contenant des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et éluées les premières au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tard, leur migration étant freinée par leur inclusion dans le gel. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire.

4. Réactifs et produits

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

- NaCl
- NaOH 10 M

composé	Poids moléculaire en kDa
Albumine bovine	66
Albumine d'oeuf	45
Glycéraldehyde 3 phosphate déhydrogenase	36
Carbonic anhydrase bovine	29
Trypsinogene pancreas bovin	24
Trypsine inhibiteur de soja	20
lactalbumine	14.2

5. Appareillage

Colonne chromatographique de type Colonne Ge Health Care : Superdex 200 (diamètre 10 mm * longueur 300 mm)

- Filtres en ester de cellulose porosité : 0,22 µm
- Coupelle
- Becher de 2 L
- Fiole jaugée 1 L
- Membranes 0,45 µm pour solution aqueuse

6. Mode opératoire

6.1. Tampon et conditions chromatographiques

Dans une coupelle, peser :

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} = 1,56 \text{ g}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} = 1,58 \text{ g}$

$\text{NaCl} = 14,63 \text{ g}$

Transvaser dans un bécher contenant 0,9 litre d'eau ultrapure . Le pH de cette solution doit être d'environ 6,5. Le ramener à $\text{pH} = 7,2$ avec du $\text{NaOH} 10 \text{ M}$.

Transvaser dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultrapure . Filtrer sur membrane $0,45 \mu\text{m}$ pour solution aqueuse.

Le débit est fixé à $0,6 \text{ ml/min}$.

6.2. Préparation des échantillons

Pour analyser par exemple un produit sous forme poudre, diluer 1 g dans 100 ml d'eau ultrapure filtrer l'échantillon sur un filtre en ester de cellulose de $0,22 \mu\text{m}$

6.3. Etalonnage de la colonne

Pour étalonner la colonne, on trace une courbe du log du poids moléculaire des étalons de poids moléculaires en fonction du temps de rétention.

Injecter la solution de l'échantillon tel que.

7. Résultats

Injecter le mélange des étalons de poids moléculaires comme indiqué au point 7.3. Tracer la courbe du log du poids moléculaire des étalons en fonction du temps de rétention. Déterminer le poids moléculaire des pics du produit à en se référant à cette courbe.

exemple de droite d'étalonnage avec une superdex 200

